



Přírodovědecká
fakulta

OPONENTSKÝ POSUDOK doktorandskej dizertačnej práce

Mgr. Jiřího Danihlíka

Vývoj metody pro purifikaci a kvantifikaci silně bazického peptidu apidaecinu, analýza hladiny včelích antimikrobiálních peptidů a jejich biologických souvislostí

Oponovaná doktorská dizertačná práca je venovaná vývoju HPLC-MS metódy stanovenia antimikrobionálneho peptidu apidaecínu a optimalizácii kvantitatívnej PCR metódy pre stanovenie relatívnej expresie génov peptidov abaecínu a izoforiem apidaecínu v jednotlivých častiach tiel včely medonosnej a následnému využitiu autorom vyvinutých metód v pekne navrhnutej pilotnej štúdii vplyvu zloženia stravy včiel na ich humorálny imunitný systém. Práca je príkladom účinného prepojenia získaných vedeckovýskumných poznatkov s ich praktickou aplikáciou.

Celá práca je napísaná sviežim spôsobom. Po formálnej stránke pozostáva z pekne a zrozumiteľne spracovaného zhrnutia súčasného stavu študovanej problematiky (imunitného systému včiel a významu, mechanizmu účinku a metód analýzy antimikrobiálnych peptidov) a mne jasného a jednoznačného komentára k jednotlivým dosiahnutým výsledkom. Popisované výsledky boli publikované formou vedeckého článku v Journal of Chromatography A a dvoch prehľadných článkov v Journal of Apicultural Research a Veterinářství v ktorých je doktorand prvým autorom. Mne osobne sa veľmi páči rukopis štúdie vplyvu výživy včiel na ich imunokompetenciu, ktorý je pripravený k zaslaniu do odborného časopisu. Dosiahnuté výsledky v pôvodných prácach predstavujú prínos vo vývoji a praktickom využití metód stanovenia predmetných antimikrobiálnych peptidov. Prehľadné články sú spracované s nadhľadom a znalosťou veci. Autor sa vo všetkých diskutovaných prácach prezentuje ako vyhranená osobnosť s výraznou zásobou invencie, experimentálnej zručnosti, trpezlivosti a pracovitosti.

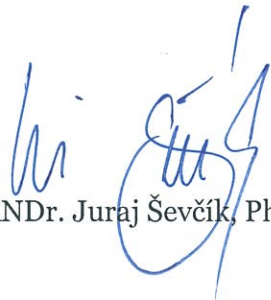
Vzhľadom k tomu, že práce boli podrobené kritickej recenzii uznávaných odborníkov v danej problematike nemám k práci žiadne pripomienky. Drobné chyby a chyby z nepozornosti boli opravené priamo v práci.

V rámci rozpravy k práci by som rád s autorom vo všeobecnej rovine diskutoval o nasledujúcich otázkach:

- dajú sa vypozerovať prvky sociálnej imunity i u ľudí?
- dokázali by ste mi na príklade včelstva vysvetliť pojmy opakovateľnosť a reprodukovateľnosť?
- mohli by ste mi priblížiť postup purifikácie biomolekúl pomocou magnetických častíc vyvinutý skupinou prof. Šafaříka (str. 28₈)?
- aké vidíte možnosti použitia elektroforetických metód pre analýzu Vami študovaných antimikrobiálnych peptidov?
- aké sú Vaše skúsenosti s opakovateľnosťou prípravy SPE kolonií (str. 36)?
- dala by sa kombináciou vhodnej stravy včiel s napr. šťaveľovou kyselinou zvyšovať ich odolnosť napr. proti varroóze?

Záverom rád konštatujem, že všetky vytýčené ciele práce – vypracovanie analýzy súčasného stavu poznania o imunitnom systéme včiel, vývoj analytickej metódy stanovenia včelích antimikrobiálnych peptidov a štúdium relatívnych zmien génovej expresie apidaecínov a abaecínu v závislosti na zložení krmných zmesí včiel – boli bezo zvyšku splnené. Rozsah vykonanej práce svedčí o doktorandovej dlhodobej skúsenosti a nevšednej orientácii v riešenej problematike. Práca svojim obsahom i formou vyhovuje podmienkam pre doktorandskú dizertačnú prácu, veľmi rád ju odporúčam k obhajobe a na základe jej úspešnej obhajoby navrhujem udeliť pánovi Mgr. Jiřímu Daníhlíkovi vedecko-akademickú hodnosť „philosophiae doctor“ („PhD“).

V Olomouci 10. novembra 2015


prof. RNDr. Juraj Ševčík, Ph.D.

Posudek na disertační práci Mgr. Jiřího Danihlíka "Vývoj metody pro purifikaci a kvantifikaci silně bazického peptidu apidaecinu. Analýza hladiny včelích antimikrobiálních peptidů a jejich biologických souvislostí".

Předložená práce se zabývá vývojem metody pro analýzu antimikrobiálního peptidu apidaecinu v těle včely medonosné a její reálné aplikace. Jedná se o velice zajímavé téma nejenom z čistě vědeckého pohledu "pro vědu", ale i z pohledu praxe.

Úvodem musím konstatovat, že vlastní zpracování disertační práce je velmi čtivě podáno. Vlastní práce je založena na 1 experimentální publikaci uchazeče a 1 přehledného článku publikovaných v kvalitních časopisech s Impact factorem a jednoho připraveného rukopisu, u kterého není zatím zmíněno, kam bude zaslán. Experimentální část, kdy byla vyvinuta metoda pro analýzu peptidu, prošla přísným recenzním řízením, i proto lze očekávat jeho vědeckou kvalitu.

Z formálního hlediska bych měl připomínku k vlastní presentaci, členění, disertace. Část Metody (3) je skutečně velice chudá a vlastní metody jsou rozebírány až v další části. Mnohdy má toto uspořádání svoji logiku, neboť metody byly průběžně vyvíjeny a čtenář má možnost sledovat logiku v jejich vývoji. Na druhou stranu například popis uspořádání pokusu s včelami (str. 59) mohl být kompletně uveden v této části. Zrovna tak některé statistické metody (např. Hornův postup pivotů - str. 52), ale i metody izolace a přečištění RNA (str. 37, 38). Některé "detaily" pak, logicky, chybí, jako například čas a g centrifugace (str. 45), popis metody stanovení proteinů (str. 48), objem eluce kolonky WCX Oasis (str. 47).

Z formálního hlediska ale vůbec nechápu rozdělení kapitol: 5 - Výsledky a diskuze, 6 - Optimalizace... a 7 - Aplikace..... Chápu, že se lépe píší výsledky a diskuze dohromady. Ale čím vybočuje "Optimalizace..." a "Aplikace..." z "Výsledků" (o diskuzi nemluvě)? Kapitola 4 by měla být součástí kapitoly 3 (Metody).

Analytický vývoj metody je velice dobře popsán a mohl by velice dobře sloužit jako vzor pro další studenty, jaká úskalí musí badatel při vývoji metody podstoupit. Co ale nechápu je, proč následující kapitola, vlastní aplikace vyvinutých metod, tudíž to, k čemu celá práce směřuje, je najednou odbyta odkazem na rukopis, který nebyl ještě ani nikam zaslán. Tento postup se volí většinou u disertace presentované formou komentovaného textu k souboru publikací (což není tento případ). Přitom například právě metodická část byla opublikována ve velice kvalitním časopise - tam by takový odkaz byl více na místě, než odkaz na nerecenzovaný manuskript. Lze říci, že se jedná o jakési "vyvrcholení" celé práce, ke kterému směřovala celá analytická práce, proto je velká škoda, že nedošlo k adekvátnímu zakončení, presentaci výsledků.

Pokud hovořím o formálnostech, tak bych ještě jenom zmínil, že se nejedná o stanovení antimikrobiálních peptidů, ale peptidu, i když se v principu jedná o 2 izoformy, které jsou ale, logicky, neodděleny a neanalyzovány zvlášť.

Trochu kuriózní je, že v životopise uchazeče jsou seznamy všeho, co kdy napsal (plakátová sdělení, neimpaktované články), ale seznam těch vědecky nejhodnotnějších, impaktovaných článků, chybí.

Celá práce je napsána s minimem chyb/překlepů, pouze jsem nenašel odkaz na publikaci Li et al (2014) (str. 19), nejspíše se jedná o Li et al (2012), na straně 15 jsem chvíli přemýšlel, co znamená "kleštík velím" než jsem pochopil, že se jedná o kleštíka včeliho. Toto jsou ovšem zcela nepodstatné překlepy.

Osobně se mně tato práce z pohledu analytika zbývajících se analýzou proteinů v biologickém materiálu velmi líbila. Postupy i výsledky v odpovídající části práce jsou jasně formulovány, opublikovány a nemám k nim výhrady.

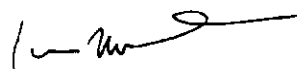
Z pohledu aplikace bych měl konkrétní dotazy:

- nepochopil jsem značení signifikancí v rukopise (ab, bc, c...) - mohl by je autor objasnit, tj. kdy jsou tyto rozdíly signifikantní a na jaké hladině?
- jaká je závislost mezi zjištěným obsahem peptidu (apidaecinu 1) a expresí genu?

Závěrem bych chtěl zdůraznit, že uvedené připomínky nejsou podstatného charakteru. Mohu tedy konstatovat, že disertant představil svoji tvůrčí schopnost samostatně vědecky pracovat. Jazyková a formální úroveň (až na několik zmíněných malých nedostatků) splňuje kritéria disertační práce. Téma práce je aktuální a aplikační. Vytyčené cíle byly splněny.

Konstatuji tedy, že disertant splnil požadavky standardně kladené na disertační práci v oboru, prokázal schopnost tvůrčí vědecké práce a doporučuji jeho práci jako podklad pro řízení k udělení vědecké hodnosti PhD.

V Praze dne 19. října 2015



prof. Ing. Ivan Mikšík, DrSc.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Vídeňská 1083

14220 Praha 4