

Posudek oponenta na diplomovou práci: Hledání nových biomarkerů neplodnosti mužů pomocí transkriptomu spermií (Anastasiya Semyakina)

Diplomová práce A. Semyakiny je sepsána na 62 tištěných stranách s použitím 69 referencí a je členěna klasickým předepsaným způsobem. DP je zaměřena na hledání biomarkerů mužské neplodnosti s využitím RNA čipů a q-RT-PCR.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Práce je pokusem o nalezení biomarkerů neplodnosti. Tvůrčí přínos v práci je však minimální a zdá se, že je spíše opakováním obdobných prací na stejné téma s využitím stejné, dnes již zastaralé, technologie. Domnívám se, že samotná experimentální činnost nemohla zabrat více než měsíc intenzivní práce, přestože k dispozici měla autorka téměř dva roky.

Formální kvalita předloženého spisu

Členění kapitol je v pořádku, trochu mi vadí odstavce o jedné větě či nepřehledné tabulky v kapitole výsledky.

Hodnocení částí předkládaného spisu

1 Úvod a Literární přehled

Tyto kapitoly jsou velmi slabé. Zaměřují se na všeobecné informace a postrádají zaostření na konkrétní hypotézy. Na straně 18 je uvedeno, že obdobné experimenty byly provedeny a opublikovány v desítkách prací. Není mi tedy jasné, proč byl experiment opakován stejnou technologií.

2 Materiál a metody

Některé části metod jsou velmi podrobné (např. RNA izolace, přepis atd.) a jiné jsou slabší. Za nejslabší považuji kapitolu ‚Zpracování dat‘. Naprosto zde chybí jakákoli informace o tom, jak byla data zpracována. Není totiž tolik důležité, jaký byl použit software, ale jaké byly použity postupy. Není zde a ani v celé diplomové práci uvedeno, jaké bylo statistické rozložení dat, jaký způsob normalizace byl proto zvolen (např. kvantilová normalizace u ne-normálně rozložených dat či ‚faktorová normalizace‘ u normálně rozložených dat). Typ rozložení ovlivňuje i výběr vhodného testu pro získání p-hodnot, což v DP také chybí. Potencionální čtenář pak nemá možnost odhadu, zda jsou výsledky získány správně či ne. U q-RT-PCR analýzy také chybí detaily testu, kterým byly získány p-hodnoty. Až ve výsledcích Tab.11 jsem se dovtípl, že byl použit t-test. Znamená to, že byla data normálně rozložena? Jaký test byl pro takový důkaz použit a jaký typ korekce pro opakované testy byl použit?

3 Výsledky

V této části je mnoho tabulek a žádný graf, který by ukazoval jaký je vztah mezi daty z mikročipu a z RT-PCR. Vzhledem k tomu, že očekáváme (či testujeme) lineární vztah použil bych liniový graf nebo box-ploty, kde na ose X je skupina a na ose Y jsou exprese z obou experimentů. Z výsledků jsem pochopil, že se podařilo ověřit expresi na čipu pomocí RT-PCR u cca 50% diferencially regulovaných RNA. To naznačuje, že výskyt falešně pozitivních výsledků je u čipu vysoký. To by naznačovalo, že primární rozložení dat nebylo normální, nebo že byly u q-RT-PCR zvoleny málo robustní house-keepingové geny. Jak byly primery vybírány a jakou metodou? Jak se posuzovala robustnost HK?

4. Diskuze

V diskuzi se autorka pokusila na necelých třech stranách textu rekapitulovat vlastní výsledky a popisuje, co bylo v její práci nejzajímavější. Naprosto ale chybí srovnání s předchozími pracemi na stejné téma s využitím stejných technologií. Autorka limitovala předchozí informace na větu „Obdobných studií na toto téma s použitím stejných metod se prováděla celá řada“, aniž by byla tato věta doložena citacemi či detailním srovnáním s vlastními výsledky. Právě proto není jisté, zda práce přináší primární výsledky, nebo odhalila stejné markery jako práce předchozí.

Dílejší připomínky k práci a otázky do diskuse

Nemohla být zvýšená exprese některých genů (např. CD46) důsledkem přítomnosti jiných leukocytů než lymfocytů v ejakulátech infertilních mužů? Autoimunitní problémy jsou totiž častým důvodem neplodnosti.

Závěr posudku:

Diplomovou práci shledávám jako problémovou, přesto ji doporučuji k obhajobě, aby měla autorka možnost se proti tomuto posudku veřejně postavit a vyvrátit mé argumenty.

doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.

9.09.2018