Posudek oponenta na diplomovou práci

☒ oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Doc. Daniel Rösel, PhD
	Datum: 5.9.2022

Autor: Bc. Eliška Šťovíčková

Název práce: Detekce hypoxických markerů v nádorech hlavy a krku

Cíle práce

Cílem práce bylo otestovat hypotézu, že se HPV pozitivní nádory hlavy a krku liší v expresi hypoxických markerů v porovnání s HPV negativními nádory hlavy a krku.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE
Rozsah práce (počet stran):
Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE
Je uveden seznam zkratek? ANO NE

Literární přehled:
Odpovídá tématu? ANO NE
Je napsán srozumitelně? ANO NE
Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO NE
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO NE

Materiál a metody:
Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE
Kolik metod bylo použito? Nelze říci bez definici co je samostatná metoda. Množství metodických přístupů, jejich diverzita a experimentální náročnost je nadprůměrná.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE

Experimentální část:
Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE
Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky?
Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?
ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?

Pro konkluzivní konstatování o vlivu HPV statusu na expresi hypoxických markerů by bylo nutné porovnávat vzorky nádorů se stejnými patologickými stadii progrese. Toto však nelze brát za závažný nedostatek diplomové práce, ale jako indicii toho, jak studii vhodně rozšířit.

Diskuze:
Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO NE

Závěry (Souhrn) :
Jsou výstižné? ANO NE

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální úroveň je dobrá. Popisovaná data jsou dobře dokumentována ve vložených obrázcích a přehledových tabulkách.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Definované cíle jsou v mezích daných omezením dostupných pacientských vzorků splněny. Práce obsahuje velké množství výsledků získaných standardními i inovativními metodickými postupy, z kterých bych vypíchnul především multispektrální imunohistochemii a pokročilou automatickou analýzu mikroskopických dat využívající prvky umělé inteligence. Celkově práci hodnotím na rozhraní mezi výbornou a velmi dobrou.

Otázky a připomínky oponenta:

Drobné připomínky:

- Některé zkratky nemají definován český význam.
- Preferoval bych místo o „prolylových a asparaginylových“ zbytcích psát o „prolinových a asparaginových“ zbytcích.
- Chybí nějaké přímé odůvodnění v rámci jednoho odstavce/kapitolky na základě jakých kritérií byly vybrány použité markery hypoxie. Vybrané markery jsou sice zmíněny v úvodu, ale bylo by vhodné shrnout důvody jejich zařazení i v kapitole výsledky.
- Prohozeno barevné kódování v tabulce 12 a v její legendě.
- U mikroskopických obrázku by bylo vhodné uvést měřítko nebo celkové zvětšení.
- Mikroskopické obrázky s multiplexovým barvením mají ve vloženém popisku označení barev, což může pomoci v hledání jednotlivých barev, ale informativnější by bylo, kdyby místo označení barvy byl uveden příslušný detekovaný protein v barevném kódování.

Otázky a komentáře:

- Bylo použito 20 HPV+ a 20 HPV- pacientských vzorků. Bohužel se soubory HPV+ a HPV- nádorů výrazně lišily co do zdrojové tkáně a především gradingu (HPV+ nádory byly predominantně grade I (85%), zatímco HPV- převážně z pokročilejších nádorů (85%)). Obojí by mohlo výrazně ovlivnit možné závěry. Prezentované výsledky totiž ukazují, že HPV- nádory mají zvýšenou expresi mRNA pro ASPH a VEGF což však platí i pro vzorky s pokročilejšími stadii. Obdobné korelace, i když s opačnou závislostí na HPV statusu, jsou vidět i na imunohistochemických vzorcích. Prosím o komentář k validitě závěrů v tomto kontextu.
- HPV status vzorků, v tomto případě definován na základě aktivní virové infekce, byl určen na základě detekce mRNA E6 viru. Hladina mRNA E6 však nebyla kvantifikována pomocí RT-qPCR, jen byly některé pozitivní vzorky označeny jako slabý signál (Tab 12). Proč? Potenciální korelace s mírou infekce by mohla být také zajímavá.

- qPCR byla prováděna pouze v technických duplikátech. Jsem si vědom limitů množství materiálu z pacientských vzorků, ale přesto si myslím, že minimálně použití technických triplikátů by bylo možné a výrazně by pomohlo statistickému vyhodnocení problematických vzorků. Navíc je trochu nejasné, jak se postupovalo v případě, že z duplikátu nebyly získány obě hodnoty Ct. V práci jsou totiž uvedena dvě podle mne protichůdná konstatováni: "Pokud jsem měla alespoň 1 Ct hodnotu v rámci duplikátu tak jsem ji použila pro celý duplikát." vs „V případě, že se mi nepodařilo získat Ct pro celý duplikát jsem předpokládala velmi nízké vstupní množství cDNA daného markeru a nahradila jsem hodnotu maximem Ct pro tento marker mezi všemi vzorky zvýšeným o 2." Prosím vysvětlete, jak se přesně v těchto případech postupovalo a k čemu uvedené věty (str 56) vlastně odkazují.
- Lze s pomocí multiplexového barvení podle intezity zabarvení kvalifikovaně usuzovat na míru přítomnosti daného markeru? Jestli ano, pak proč se analýza omezila jen na konstatování přítomnosti/nepřítomnosti specifického signálu v jednotlivých buňkách a nebyl brán zřetel i na míru intenzity signálu v buňkách.

Návrh hodnocení oponenta

☒ výborně ☐ velmi dobře ☐ dobře ☐ nevyhověl(a)

Podpis oponenta: