

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : **Ivan Leontovyc**

Název práce: **Diferenciace kmenových buněk na β -buňky, které produkují insulin**

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte právě jednu z možností)

1. Rozsah DP a její členění	
X	A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí
	B - nevyrovnané, členění není logické n. rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	N - nedostatečné

2. Odborná správnost	
	A - výborná, bez závažnějších připomínek
X	B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků)
	C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami
	N - nevyhovující, s hrubými chybami

3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů	
X	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
	B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací
	C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat
	N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)

4. Jazyk práce	
X	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
	C - uspokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

5. Formální a grafická úroveň práce	
	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
X	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod.
	C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo četnějšími drobnými chybami
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5. :

AD 1. Rozsah DP a její členění:

Předložená diplomová práce Ivana Leontovyče na téma diferenciací kmenových buněk na β -buňky, které produkují insulin, je zaměřena na sledování schopnosti diferenciací dukálních buněk exokrinní tkáně pankreatu na funkční β -buňky. Na základě literární rešerše jsou vytipovány a testovány čtyři růstové faktory, které se mohou podílet na diferenciací pankreatických kmenových buněk směrem k β -buňkám. Autorovi se podařilo prokázat, že neendokrinní část pankreatu obsahuje buňky, které jsou schopné takové diferenciací a že tato diferenciací je podpořena přítomností růstových faktorů LIF a noggin.

Práce je členěna do 7 částí zahrnujících úvod, cíl práce, metodiku, výsledky, diskuzi, závěr a použitou literaturu. Text je doplněn o obrazovou přílohu ve formě 9 tabulek a 13 obrázků.

Metodický záběr je široký a pokrývá techniky z oblasti buněčné biologie, radio- a imunochemie a molekulární biologie.

Členění i rozsah plně odpovídá charakteru diplomové práce.

AD 2. Odborná správnost:

Po odborné stránce se jedná o velmi podařenou práci.

Úvodní část je srozumitelná a trefně shrnuje dosavadní poznání. Cíl práce je jasně definován.

V metodice jsou drobné nedostatky:

- u některých roztoků není zcela jednoznačné složení (není uvedena molární ani hmotnostní koncentrace obsažených látek),
- chybí zmínka o tom, jakým způsobem byla sledována sekrece C-peptidu u diferencovaných buněk (metodika se zabývá pouze stanovením obsahu C-peptidu v buňkách) a není nijak specifikovaná RIA metoda, kterou bylo stanovení prováděno.
- v protokolu RT-PCR nejsou uvedeny koncentrace použitých primerů a alespoň orientační množství templátu, v programu thermocycleru není uveden konkrétní parametr času a teploty pro nasedání primeru
- postrádám jednoznačné zdůvodnění, proč byl stanovován glukagon a cytokeratin-19.

Ve výsledkové části bych vytkl jen nedostatečný komentář k metodě RT-PCR. Na to, o jak obsáhlé srovnání se jedná, je rozbor výsledků velice strohý: „*Nejlepší kombinací pro diferenciací směrem k β -buňkám jsou růstové faktory LIF a noggin*“. Navíc si nejsem plně jist, zda prezentovaný záznam na elektroforeogramu takto jednoznačné zhodnocení dovoluje.

Výsledková část je jinak až na výjimky kompaktní a spolu s dobře argumentovanou diskuzí vede k jasnému závěru.

V textu lze místy narazit na drobné nepřesnosti, které však považuji spíše za stylistické chyby, např.:

- „*PDX-1 je jaderný protein o velikosti 282 aminokyselin. Protein PDX-1 se vyskytuje ve velikostech 31 a 45 kDa.*“
- „*Vzniklý roztok byl enzymově štěpen při 37°C po dobu 20-30 minut ve vodní lázni*“
- „*Stanovení obsahu C-peptidu v buňkách po statických inkubacích potvrdilo zvýšenou přítomnost tohoto proteinu.*“
- „*Střídala se fáze denaturace s navázáním nukleotidů (annealing)...*“

AD 3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů:

Práce obsahuje 36 citací, přičemž v 35 případech se jedná o přímé reference na publikace v odborných časopisech a v jednom případě o knihu pojednávající o základech diabetologie. Není použita ani jedna nepřímá citace přejatá z jiného zdroje. Reference jsou v textu používány uvážlivě, a to jak v úvodní části, tak v sekci diskuze. Všechny citované práce souvisejí s tématem a jsou vhodně vybrány.

AD 4. Jazyk práce:

Práce je napsána velmi čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických nebo pravopisných chyb. Pouze místy se stává čtení obtížné, což je dáno opakovanou reedicí odstavců a odpovídá to běžnému standardu diplomových prací. V jedné či dvou kapitolách dochází k redundancím, kdy se autor po několika odstavcích vrací se sdělením již dříve zmíněným.

V předložené práci je nejednotný pravopis používání s/z (např.: *insulin, glukosa, fibrosa, apoptosa*, atd... versus *homeostáza, plazmatická membrána, diskuze*, atd...). Nejednotné je také značení nukleárních transkripčních faktorů. Většinou jsou zde zkratky uváděny konsenzuálně s velkým písmenem na začátku (*NeuroD, Ngn3, MafA*), mnohdy však lze narazit na kombinaci se zkratkami psanými malým písmem (*neuroD, ngn3, mafA*), např. v Obr. 1.

AD 5. Formální a grafická úroveň práce

Formální a grafická úroveň práce je velmi dobrá. Ojedinele se vyskytují zanedbatelné chyby ve formátu citací (občas chybí čárka oddělující číslo periodika od čísla stránek). V textu se čas od času objevují zkratky, u kterých není v závorce uvedené vysvětlení a zároveň nebyly definovány na počátku diplomové práce (např.: *HNF, HEPES, EDTA*, a další), obecně se však jedná o zkratky odborné veřejnosti všeobecně známé. Mnohé zkratky, které jsou již na počátku definovány, jsou na druhou stranu opakovaně rozepisovány v textu (např.: *PBS*, atd...)

Nejednotně jsou uváděny odkazy na výrobce přístrojů a dodavatele chemikálií. V několika případech chybí lokalizace sídla společnosti, někdy je země původu uváděna ve zkratce, jindy slovně.

U obrázku č. 1 postrádám legendu a není zde jasné jaký význam má použití žluté a bílé barvy u označení nukleárních transkripčních faktorů.

Závěrečné shrnutí:

Přes všechny výše zmíněné připomínky považuji předloženou diplomovou práci za nadstandardní a doporučuji k dalšímu řízení.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1. V metodice je v případě radio-imunologického stanovení C-peptidu uvedeno, že ke statické inkubaci v roztoku glukózy byl použit ekvivalent buněčné suspenze po ukončené diferenciaci o objemu 1ml, přičemž není zmínka o koncentraci buněk v dané suspenzi. Byly tyto kultury před stanovením nějak kvantifikovány?

2. Po izolaci RNA z kmenových buněk po cílené diferenciaci byla stanovena koncentrace RNA. Byla také kontrolována i kvalita použité RNA před aplikací v RT-PCR?

3. Během kultivace a cílené diferenciaci byla primární buněčná kultura mikroskopicky monitorována před zahájením kultivace a následně v druhém a třetím dni kultivace. U všech snímků je uvedeno stejné zvětšení, přičemž velikost samostatných buněk v záznamu před kultivací a v průběhu kultivace se výrazně opticky liší. Čím je to dáno?

4. Podle údajů z literatury (Baeyens et al., 2005) má LIF v kombinaci s EGF prokazatelný vliv na diferenciaci ve směru k buňkám produkujícím inzulin u potkana. Z výsledků radio-imunologického stanovení C-peptidu v předložené práci však vyplývá, že poměr buněk produkujících inzulin je v případě kultivace za přítomnosti LIF a EGF (obsaženo v kultivačním mediu) výrazně nižší, než u buněk neošetřených LIF. Koncentrace C-peptidu je srovnatelná s buňkami kultivovanými v prostředí BMP-2. Podobný stav je patrný i u exprese inzulinu a glukagonu dokumentované na Obr. 13. Jak si tuto diskrepanci vašich a literárních zjištění

Dotazy k obhajobě

vysvětľujete? Jak si vysvětľujete fakt, že přidání antagonisty BMP-2, který sám o sobě nijak neinteraguje s LIF vede k výraznému posunu v diferenciaci duktálních buněk ve směru k β -buněkám?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu ~~JE~~ / NENÍ (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Práci **doporučuji** k přijetí k dalšímu řízení: ANO / ~~NE~~

Navrhovaná celková klasifikace *A*

Datum vypracování posudku: **18.5.2010**

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): **Ondřej Lukšan**