

Posudek disertační práce

s názvem

Změna vybraných proteinů v reakci na genotoxický stres

Mgr. Jana Čmielová

doktorský studijní program

Lékařská chemie a biochemie

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Disertační práce je rozdělena na úvodní část (strana 8 – 21), vlastní práci (strana 22 – 64), seznam použité literatury (strana 65 – 74) a přílohu, která se skládá z osmi vložených publikací. V úvodu je zařazena problematika buněčných proteinů, které se zapojují do procesů spojených s poškozením a opravou DNA, kontrolou buněčného cyklu a apoptózy. Ve druhé části úvodu se autorka věnuje apoptóze a senescenci buněk. Závěr úvodu obsahuje zpracované informace o kmenových, zejména mesenchymálních buňkách, buňkách dentální pulpy a periodontálního ligamenta. V závěru úvodu je zmínka o lidské embryonální plicní fibroblastové linii WI-38, se kterou byla provedena část experimentů.

Vlastní disertační práce je správně strukturována. Cíl práce definuje šest okruhů, které předkládaná práce řeší, dále je zde materiál a metodika, výsledky, diskuse a závěr. Celkem práce obsahuje 24 obrázků a necelých 10 stran citací.

Otázky nebo připomínky oponenta:

1. Str. 15: Řádek č. 5 obsahuje drobný překlep: namísto „kaspázu 3“ je napsáno „kaspáu 3“.
2. Str. 25: Oddíl 3.4 - část analýz byla provedena na jiném průtokovém cytometru a pomocí jiného vyhodnocovacího programu než je v práci uvedeno.
3. Str. 25: V oddíle 3.4 uveďte počet vzorků v jednotlivých souborech.
4. Str. 25: V oddíle 3.5 „Detekce apoptózy“ není oponentovi jasné vyjádření: „ Pro každou skupinu bylo použito 1×10^6 buněk“.
5. Doplňte směrodatné odchylky v obrázku č.1
6. Str. 29: V obrázku č. 5 mají kontrolní buňky v pozdních stádiích apoptózy (Annexin V⁺PI⁺) vyšší počet Annexin V vazebných míst, protože signál v detektoru FITC se zdá být vyšší než u ozářených vzorků. Lze takovýto jev nějak vysvětlit?

7. Str. 30, 39, 40: Z žádného obrázku ani textu není patrné, jak autorka přistoupila k diskriminaci dubletů a vícenásobných multipletů při analýze DNA průtokovou cytometrií tak, aby nedocházelo k falešnému navýšení buněk v G2/M fázi. Naopak se z několika obrázků (např. na str. 30 obr. č. 6 - kontrola, str. 39 obr. 13 všechny bodové diagramy, str. 40 obr.14A) zdá, že tato metodická podmínka byla opomenuta. Sice se takto pravděpodobně nezmění trendy v experimentálních datech, ale rozhodně dojde ke změnám procentuálního zastoupení a relativizaci výsledků. Např. zastoupení vyšších multipletů je na obr. 6 (str. 30) vizuálně mnohem vyšší u kontroly než u ozářených vzorků, což zároveň naznačuje vyšší procento dubletů, které zvyšuje relativní počet G2/M buněk v analýze kontrolního vzorku.
8. Str. 31: Na obr. č. 7 prosím o objasnění pozitivní exprese proteinu p21 u kontrolního vzorku. Dále prosím o ukázání dalších kontrolních blotů, které tento trend potvrzují.
9. Str. 35: První odstavec na straně 35 neodpovídá datům uvedeným v obr. č. 10.
10. Str. 35: Z textu ani analýz není jasné, jak autorka hodnotila populaci subG0/G1 (obr. 10). Prosím o vysvětlení.
11. Str. 47: Na obr. č.18D chybí ve dni šest při jednotlivých dávkách ozáření tečkový diagram s propidium jodidem. U všech diagramů chybí relativní zastoupení měřených populací.
12. Str. 47: Na obr. č.18D oponent nerozumí vyjádření u popisu obrázku: „Výsledky 1 ze 3 nezávislých experimentů“
13. V práci není nikde uvedeno, jakým způsobem byly vzorky statisticky zpracovány.

ZÁVĚR:

Mgr. Jana Čmielová zpracovala přes drobné odstranitelné nedostatky zajímavé a aktuální odborné téma pomocí náročných metodik a projevila schopnost interpretovat dosažené výsledky a zaujmout k nim kritické stanovisko. Výsledky významně obohatily současné poznání o změnách proteinů po působení genotoxického stresu.

Disertační práce splňuje nároky na ni kladené a proto ji doporučuji k obhajobě.