

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Mgr. Martin Kuthan, PhD.

Datum: 12.9.2014

Autor: Bc. Romana Čuperková

Název práce:

Optimalizace postupů pro kvantifikaci miRNA z tenkojehlových bioptických vzorků karcinomu pankreatu.

### Cíle práce

Optimalizace laboratorního postupu pro kvantifikaci miRNA u vzorků získaných pomocí EUS-FNB za účelem zpřesnění diagnostiky a odhadu prognózy karcinomu pankreatu.

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 98

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO, v práci je citováno 142 literárních pramenů, přičemž více než pětina citovaných prací byla publikována během posledních tří let.

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? Byla použita celá škála metod práce s nukleovými kyselinami (zahrnující různé postupy izolace RNA a DNA, elektroforetickou analýzu, různé varianty PCR či heteroduplexní analýzu)

Jsou metody srozumitelně popsány? NE. Čtvrtá část práce s názvem Materiál a metodika je totiž značně nepřehledná. Autorka začíná popis každé metody podle mého názoru až zbytečně podrobným výčtem laboratorního vybavení. Moje podstatnější výhrada se týká samotného popisu pracovních postupů u jednotlivých metod. Postup je psán rozvláčně a působí jako kříženec laboratorního deníku s firemními protokoly, takže není jasně zřetelné, co je standardní postup doporučený výrobcem a co je odchylka od tohoto postupu. Velmi podrobně je popisován pipetovaný objem všech možných "ingrediencí", avšak chybí (byť i orientační) údaje o koncentracích nukleových kyselin či primerů. Dokonce ani u agarózové elektroforézy není jasné, co měla autorka na mysli 20x zředěným TBE puřem (jehož "nějaká" koncentrace je uvedena v popisu bez uvedení zda jde o finální koncentraci). Rozhodně by u jednotlivých metod neškodil rozumný popis principu příslušné metody (autorka se totiž často omezuje na pouhé konstatování že např. "šlo o použití odlišné teploty a času").

**Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, ale je poměrně nepřehledná. Kapitola 5 Výsledky sice začíná slibným schématem popisujícím logiku postupu, ale v dalších podkapitolách se již objevují:

různé méně logické odbočky - např. str. 60 "izolační soupravy se liší v elučních objemech, a tak je při takto nízkých koncentracích žádoucí získat, co nejvyšší objem RNA."

různé nepřesnosti a nejasnosti - např. str. 60 pod tabulkou 5.3. s uvedenými koncentracemi NK se v hlavním textu objeví formulace: "Protože jsem eluovala DNA do stejného objemu 40  $\mu$ l u všech RNA souprav, je výsledný celkový výtěžek v ng rovný čtyřicetinásobku naměřené koncentrace."

neobratné formulace - např. str. 71 "Na příkladu kvantifikace referenčního genu RNU6b na Obr. 5.13 se nespecificky amplifikovala negativní kontrola reverzní transkripce. Analýzou disociační křivky bylo odhaleno, že se nejedná o shodný produkt a na výsledky Ct hodnot vzorků to tedy nemá vliv."

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

ANO, ale samotný popis výsledků je často poměrně zjednodušený a nepřesný. Např. na základě výsledku elektroforézy konstatuje autorka na str. 62 "...jsem získala nejvyšší výtěžky NK a nepřímo amplifikací stanovila jedny z nejvyšších koncentrací RNA o vysoké kvalitě..."

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? NE, diskuze je asi nejslabší částí práce a omezuje se hlavně na popis vlastních výsledků.

Navyše obsahuje množství zbytečných a nepřehledných formulací jako např. na str. 80:

"Pro naše účely nepřicházela v úvahu možnost rozpuštění původního vzorku, a to kvůli malé velikosti a velmi velké pravděpodobnosti jiného zastoupení nádorových buněk v každé z polovin vzorku. Další možností by byla izolace DNA i RNA najednou z jednoho vzorku s následným ošetřením poloviny získaných NK DNázou (pro získání RNA) a druhé poloviny RNázou (pro získání DNA). Tímto způsobem bychom však přišli o polovinu množství získané RNA, což by z takto malých vzorků mohlo vést k nemožnosti dále analyzovat miRNA"

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? Pouze minimálně, podstatná část diskuze je v podstatě bez citací.

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

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

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

Formální a jazyková úroveň práce je dobrá, práce obsahuje pouze minimum překlepů a chyb. U některých obrázků by bylo potřeba použít vyšší rozlišení (zejména obrázky 5.11 až 5.14)

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

**Autorka splnila stanovené cíle práce, avšak celkově působí předložená diplomová práce Romany Čuperkové poněkud nevyváženým dojmem. Literární přehled je zpracován pečlivě a čtenář dostane ucelené a logicky uspořádané informace. Totéž však nemohu konstatovat o dalších částech práce. Text je daleko méně přehledný, místy autorka popisuje přílišné detaily, avšak podstatnější údaje často chybí. Pokládám proto za velkou škodu, že práce se zajímavým nápadem a potenciálně úžasným praktickým dopadem utrpěla od autorky při zpracování textu "zbytečné rány pod pás".**

**Celkové hodnocení:**

**I přes výše uvedené výhrady je možné doporučit diplomovou práci Romany Čuperkové k obhajobě.**

**Otázky a připomínky oponenta:**

Vysvětlíte tvrzení na str. 33: Citlivost EUS-FNB je 84 %, specifita až 97 %. Nevýhodou je poměrně nízká negativní predikční hodnota, která se pohybuje okolo 50 - 60 % ...

V kap. 2.5.3 popisujete využití RNU6b pro normalizaci qRT-PCR. V literárním přehledu zmiňujete i další krátké RNA používané pro normalizaci qRT-PCR (např. U44, miR-16). Jaké jsou výhody, nevýhody či rizika jejich použití?

Na základě čeho se domníváte, že v kap. 5.2.2 je nejlepší použití soupravy RT1. Sice chápu vnitřní logiku tohoto závěru, ale popis v textu je poměrně "spartánský".

Co znamená pojem "účinnost primerů" str. 68?

Výpočet zastoupení mutovaných buněk by si zasloužil i nějaký obrázek z heteroduplexní analýzy, aby bylo jasné, co znamená "výpočet na základě plochy hrotu" na str. 72.

str. 30 pravděpodobně chybí citace

str. 31 řádek 7 - pravděpodobně chybí citace

str. 37 nedomnívám se, že správná citace pro popis fungování proteinu Ras je disertační práce Dr. Benešové (obdobně tentýž zdroj použitý na straně 38.) V těchto případech je nutné použít primární zdroje, nebo přinejhorším odkaz na učebnice, jedná-li se o obecně známá fakta.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: