

***Oponentský posudek disertační práce MUDr. Davida Rychtrmoe
„Studium regulace regenerace jater za využití metod molekulární genetiky“***

Pro svou disertační práci si MUDr. David Rychtrmoc vybral velmi zajímavé a aktuální téma jaterní regenerace, ve které se zaměřil především na poměrně opomíjenou fázi terminace regenerace.

K identifikaci možných regulačních faktorů použil analýzu exprese pomocí DNA čipů s následnou verifikací vybraných genů qPCR. Zvolená metodika je pro daný účel adekvátní, nicméně zvláště analýza pomocí čipů skýtá celou řadu možných úskalí a interpretace výsledků je více než nesnadná. Autor prokázal, že se v dané problematice výborně orientuje a je si evidentně vědom možných slabin zvoleného přístupu. Použil dostupné preanalytické i bioinformatické nástroje k tomu, aby jeho výsledky byly věrohodné. Získaná data proto hodnotím jako velmi kvalitní a nemám k nim žádnou výtku. K vlastnímu zpracování disertační práce však několik výhrad mám.

Cíle práce jsou nastíněny jen velmi neurčitě a obecně, v disertační práci postrádám definování pracovní hypotézy.

Metodická část je poměrně nevyvážená. Na jednu stranu jsou zde snad až příliš detailní popisy některých postupů, na stranu druhou v práci není například uvedena metoda, jakou byly měřeny aktivity transamináz a úplně zde chybí popis statistického zpracování dat (použitý statistický test je zmíněn jen v legendách pod obrázky ve výsledkové části). Namísto ilustračních elektroforeogramů nukleových kyselin, převzatých z cizí práce, bych zde uvítal autorova vlastní data.

Z celkem pěti identifikovaných kandidátních funkčních skupin genů, které se zdají být důležité v pozdní fázi jaterní regenerace, se autor rozhodl dále neanalyzovat skupinu ribosomálních komponent. Přesto této skupině v diskusi věnuje značný prostor a poukazuje na zajímavá data jiných pracovních skupin s povzdechem, že veškeré doposud popsané výsledky pocházejí jen z iniciální fáze jaterní regenerace. Úloha ribosomálních komponent v terminaci tak zůstává otevřená. Zde disertant mohl (a snad i měl) být prvním, kdo tuto otázku vyřeší.

Podobně i signální dráha p53 byla „zavrhnuta“ v okamžiku, když nebylo dosaženo shody mezi DNA čipem a qPCR. To považuji za unáhlené a zvláště u genu Ppm1d, u něhož je qPCR expresní profil velmi zajímavý, bych doporučil verifikaci druhým setem primerů.

Celkově hodnotím výsledky předložené disertace jako velmi dobré a zejména bioinformatickou analýzu jako nadprůměrnou. Závěry jsou převážně popisné, nicméně to lze vzhledem ke komplexnosti zvoleného tématu očekávat. Práci by výrazně pomohlo, kdyby autor alespoň nastínil, jak hodlá se získanými daty dále naložit.

Z poskytnutých materiálů vyplývá, že MUDr. Rychtrmoc je prvním autorem pouze jedné původní práce. Je tak otázkou, zdali splňuje podmínku uvedenou v opatření děkana LF HK č. 7/06-07: *Doplnění podmínek pro předložení DDP*. Pokud oborová rada považuje tuto připomínku za bezpředmětnou, doporučuji práci k obhajobě.

MUDr. Martin Leníček, Ph.D.

Na autora mám následující otázky:

- Jaký přesně byl doktorandův podíl na této práci? V závěru je poněkud nešťastná formulace, že jeho osobním přínosem bylo zprostředkování spolupráce se společností GENERI BIOTECH.
- Čtyři kandidátní funkční skupiny genů byly validovány pomocí qPCR. Proč byla qPCR verifikace provedena pouze u některých zástupců těchto funkčních skupin? Podle jakých kritérií byly zástupci vybíráni?
- Plánujete dále verifikovat úlohu identifikovaných funkčních skupin genů? Jakým způsobem?
- Jaké plány máte se zbytkem identifikovaných „zajímavých“ genů, které nebyly zařazeny do žádné funkční skupiny genů?
- Testovali jste rozsah linearitu pro qPCR analýzy? V jakém rozmezí se pohybovaly účinnosti amplifikace?
- Proč byl pro přípravu cDNA vždy použit oligo dT primer? Nebylo by vhodné, vzhledem k možné tvorbě vlásenek, alespoň při verifikaci použít random hexamery?