

Posudek školitele na diplomovou práci

X školitelský posudek	Jméno školitele: RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.
	Datum: 9.9.2015
Autor: Radan MATURA	
Název práce: Vliv fixačních činidel na kvalitu a kvantitu nukleových kyselin v archivovaných vzorcích tkání	
Zadané cíle práce, včetně tématu literárního přehledu: Cílem diplomové práce bylo sumarizovat možnosti optimalizace procesu fixace tkání formaldehydem a optimalizace procesu izolace DNA z tkání fixovaných formaldehydem vzhledem ke kvalitě získané DNA a shrnout metodické přístupy měření kvality DNA. Cílem experimentální práce bylo určit vliv složení fixačních činidel (zejména formaldehydu) a doby fixace na kvalitu a kvantitu následně izolované DNA. Autor tyto zadané cíle (s výhradami uvedenými níže) splnil.	
Přístup studenta k práci s literaturou: Student s literaturou pracoval vcelku dobře, nedostatky v citování jsou zejména v rámci diskuze.	
Přístup studenta k práci v laboratoři (přístup při učení se nových metod, aktivita, samostatnost, systematickosti práce i docházky do laboratoře): Student je při práci v laboratoři poměrně pomalý, ale na druhou stranu lze kladně hodnotit jeho aktivní přístup při návrhu a modifikaci experimentů. S jeho docházkou do laboratoře nebyly větší problémy. Stejně tak nejsou větší připomínky k samostatnosti a postupu provádění experimentů.	
Přístup studenta při sepisování práce: Student ve většině případů neplnil zadané termíny předkládání textu diplomové práce. Za zcela fatální považuji to, že student nepředložil školiteli ani po opakovaných urgencích finální verzi školiteli a přes jeho výslovný nesouhlas práci podal. Díky tomu nemohla být zajištěna kvalita některých kapitol, zejména se pak jednalo o výsledky, diskuze a závěr. Díky nemožnosti korekce finální verze ze strany školitele je v práci poměrně velké množství chyb a nepřesností, jako například tyto: <ul style="list-style-type: none">• V metodice chybí některé použité metody (například statistika)• V práci není citováno souhlasné stanovisko Etické komise 2LF UK se zamýšlenými experimenty s tkáněmi zemřelých osob.• Na straně 27 uvádí, že použitá destilovaná voda byla vlastní výroby. Toto je nepravdivé tvrzení.• U popisu tkání (kapitola 3.1.3) chybí teplotní profily• U Fixace II (strana 27) a následně v celé diplomové práci je uveden chybný PMI. Namísto 4 dnů to má být 7.	

- Kapitola 3.2.4. by měla být součástí kapitoly 3.2.5 Izolace DNA
- V Kapitole 3.2.7. uvádí, že byl použit standard, ale již neuvádí, jaký standard byl použit (například NIST)
- Chybí detailní vysvětlení proč u jater je tak patrný rozdíl v koncentraci DNA mezi 4NF a 4PF (obrázek č.1). V diskuzi (str.63) je zmíněno pouze nepřímo.
- V diskuzi je nedostatečně komunikováno zjištění z obrázku č.2 (10x menší koncentrace než u qPCR).
- Na straně 40 student uvádí“ Zároveň se tyto fragmenty nacházejí ve vzorku v nižších koncentracích“. V diplomové práci tyto hodnoty uvedeny nikde nejsou a není zřejmé, odkud je čerpá.
- Na straně 40 student dále uvádí „Tyto výsledky nasvědčují tomu, že při fixaci v roztoku 4NF dochází oproti fixaci v roztoku 4PF k nižším výtěžkům DNA při izolaci a tato DNA je více fragmentována.“ Tvrzení o fragmentaci z grafu ale nevyplývá.
- Na straně 40 student dále tvrdí „v elektroforetogramu pro vzorky fixované v roztoku 36NF se tyto fragmenty přesunuly k délkám kolem 2 500 bp)“. Zde není jasné, kde student čerpal údaje pro své tvrzení, protože koncentrace byla tak nízká, že čipem změřena nebyla.
- V popisu obrázku č.3 je uvedeno „na ose y je vynesena koncentrace DNA“. Toto tvrzení se nezakládá na pravdě, protože koncentrace se zjistí přepočtem proti standardu, ale rozhodně není vynesena na ose. Tento problém se vyskytuje i u následujících obrázků.
- Kapitoly 4.1.2 a 4.2.2 mají stejný název a kapitola 4.2.2. je jen rozšířením předchozího textu. Toto je dosti nelogické a zavádějící.
- V kapitole 4.2.3 jsou z části opakovány výsledky z kapitoly 4.1.3.. Uvádění výsledků by mělo být řešeno jinak.
- Výsledky z fixace I (strana 51) by měly být uvedeny alespoň v příloze.
- Výsledky z fixace III by měly být uvedeny samostatně (strana 51). Není možné udělat průměrné hodnoty z Fixace II a III. Jedná se o 2 různé mrtvoly s různými PMI a různým teplotním profilem před fixací.
- Na straně 52 je uvedeno „Pokles v koncentraci DNA získané ze vzorků fixovaných roztokem 4NF v porovnání s fixací v roztoku 4PF, byl statisticky signifikantní pouze u vzorku srdce fixovaného po dobu 22 a 46 hod.“ Problém je, že statistika vůbec není uvedena v Metodice. S tím souvisí i deficienze statistického vyhodnocení ve výsledcích. Pokud student tvrdí, že je něco statisticky signifikantní, tak musí uvést konkrétní hodnoty, které toto tvrzení podporují. Bez řádného statistického vyhodnocení pak není možné posoudit, zda byl počet provedených experimentů dostatečný či nikoli.
- Na straně 53 je uveden odkaz na statistický test (Mann-Whitney test), ale v metodice tento test chybí.
- Název kapitoly 4.5 je zavádějící „V závislosti na chemickém složení fixačního roztoku formaldehydu a délce fixace se mění možnosti provedení STR analýzy“ namísto provedení STR analýzu by se měla použít formulace „získání kvalitního DNA profilu“.
- Na straně 53 student uvádí „Při fixaci v roztoku 36NF již u vzorku dochází k viditelnému snížení výšky píků“. Toto porovnání není na místě, protože při přípravě vzorku do sekvenátoru nebyly vzorky stejně ředěny. V další větě je pak tvrzení „některých systémů dokonce dochází ke drop-out efektu“, ale to není pravda pro vzorek 36NF na obrázku 12.
- Výsledky na obrázcích č.12 a č.13 se týkají svalů a ne srdce, jak je chybně uvedeno.

- Na straně 56 je nutné ve větě „V případě vzorku fixovaného v roztoku 4NF dochází s prodlužujícím se fixačním časem k významnějšímu snížení výšky píků“ doplnit, u jakého STR systému došlo k popisovanému efektu.
- Zcela nepochopitelně jsou výsledky elektroforetogramy pro vzorky fixované v roztocích 4PF+K a 4NF+NaOH (strana 56 a dále) zařazeny do přílohy a nejsou součástí výsledkové části.
- Ve výsledcích zcela postrádám porovnání výšky píků heterozygotních STR a další porovnání výsledných DNA profilů.
- Na obrázku č.14 by měla být ve shodě s předchozím značením použita šipka šedé barvy a nikoli černá. Hodnota RFU 445 je výrazně nad prahem detekce.
- Na obrázku č.15 by měla být ve shodě s předchozím značením použita šipka šedé barvy a nikoli černá. Naopak chybí černá šipka u D16S539 (46 hodin).
- V rámci práce byl proveden dotazníkový průzkum, ale ve výsledcích není uveden, pouze v příloze.
- V diskuzi jako celku chybí důsledné porovnání s literaturou. Diskuze je v uvedené podobě spíše souhrnem výsledků.
- V diskuzi na straně 60 je uvedeno „u velkých fragmentů (řádově 10^3 bp) lze vypočítat snížení koncentrace.“, ale ve výsledkové části nenalezneme data na podporu tohoto tvrzení.
- V diskuzi na straně 60 je uvedeno „Při fixaci 22 hod. je pozorovatelný úbytek intenzity signálu a při 46 hod. fixaci dochází až k alelickému drop-out efektu.“ Toto tvrzení není pravdivé, došlo jen ke snížení RFU u jednoho z píků.
- Na straně 62 je uvedeno „Další možností je také odlišná hustota jader v různých tkáních, ale chybí odkaz na odpovídající literaturu.“
- V práci pak chybí to nejdůležitější: **DOPORUČENÍ PRO PRACOVNÍSTĚ PROVÁDĚJÍ FIXACI TKÁNÍ STRAN KONTROLY KVALITY FIXAČNÍCH ROZTOKŮ A DÉLKY FIXACE.** Tato doporučení se pak měla artikulovat směrem k pracovištím ústavů soudních lékařství a patologie. V souhrnu na straně 63 se sice uvádí „V případě, že si nejsme jisti kvalitou formaldehydu, je třeba dbát na to, aby fixace trvala pouze nezbytně dlouhou dobu.“, ale bohužel důležitý údaj o době fixace **CHYBÍ!**

Na některých místech práce student používá zvláštní výrazy (například amplifikační dynamika, zkumavkový filtr (namísto výrazu kolonka) na straně 32.) a v práci se vykytují překlepy. Na druhou stranu oceňuji grafickou stránku práce, zejména grafů.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce (zjištění vlivy fixačních činidel na použitelnost vzorků pro identifikační DNA analýzu) byly v zásadě splněny, ale vzhledem k zásadním chybám v uvádění výsledků (chybně označená tkáň, PMI, deficiencie statistického vyhodnocení a podobně) a nedostatkům v diskuzi nedoporučuji práci Radana MATURY k dalšímu řízení. Po přepracování a doplnění bude práce zcela určitě hodnocena výborně nebo velmi dobře.

Návrh hodnocení školitele:

výborně velmi dobře dobře **nevyhověl**

Podpis školitele:

Vasek