

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra Biochemických věd

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Autor/ka práce: **Aneta Nová**

Vedoucí/školicel/ka práce: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D. Rok obhajoby: 2018

Konzultant/ka práce: RNDr. Klára Kubelková, Ph.D.

Oponent/ka práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Název práce:

Cytomegalovirová infekce kmenem HCMV a její vztah k imunosupresi

Rozsah práce: počet stran: 125, počet obrázků: 45, počet tabulek: 20, počet citací: 235

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: dobrá
- c) Zpracování teoretické části: velmi dobré
- d) Popis metod: dobrý
- e) Prezentace výsledků: dobrá
- f) Diskuse, závěry: dobré
- g) Teoretický či praktický přínos práce: velmi dobrý

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení: Hodnocená diplomová práce je nezvykle rozsáhlá jak počtem stran, počtem citací a také množstvím experimentální práce. Nicméně zpracování trpí více či méně závažnými nedostatky a celkově se dá říct, že práce je vysoce nekonzistentní.

Připomínky mám už k použití zkratk. V jejich seznamu se vyskytují také symboly pro prvky a chemické vzorce a také některé značky jednotek SI. Toto nejsou zkratky a tedy do seznamu nepatří. Použití jednotek SI není správné. Značka jednotky minuta je min a tedy správný zápis je 15 min, 15 minut je špatně. Stejně tak není možné použít v popisu v obrázku 15'', nebo dokonce 15''. Nehledě k tomu, že inkubace 15 s není jinde v textu uvedena a tedy se jedná pravděpodobně o záměnu značky pro minutu za značku pro sekundu a to ještě použitelnou pouze pro označení úhlové velikosti. Není možné v odborném textu u radioizotopů psát "kobalt 60" a poté si zavést dokonce "zkratku". Práce s dalšími zkratkami je nekonzistentní, někdy jsou zkratky vysvětleny (PARP), jindy ne (TNB, STAT, ATCC), v textu se objevuje jak STAT, tak i Stat. V textu se vyskytují velmi často pravopisné chyby, slangové výrazy a především chybné základní chemické názvosloví, některé látky jsou česky, jiné napůl česky a jiné jsou anglicky. Vyskytují se i faktické chemické chyby, jako např. záměna síranu měďnatého za sulfid! Také ostatní terminologie je místy úsměvná, ale přesto zcela chybná (např. rekombinační cytomegalovirus, dva typy morfologických buněk, chřestová peroxidáza, křenová HRP peroxidáza atd.). Popisky obrázků jsou v některých případech umístěny na jiné stránce než obrázek.

Teoretická část je zpracována poměrně kvalitně, kapitoly na sebe navazují, celkově je teoretická část čtivá a má logickou strukturu. Rušivě působí jen pravopisné chyby a místy podivná slovní spojení pravděpodobně díky krkolomnému překladu z angličtiny, která

způsobují horší interpretovatelnost textu. Formátování citací jak v textu (někdy se vyskytuje číslovaný formát citací - např. kapitola 2.1.2, kde je jedinou citací jednička za kapitolou), tak i v části Seznam citované literatury je zcela nekonzistentní, vypadá to, jako by byly jednotlivé citace (nebo i části textu, v případě kapitoly 2.6.1, kde se vedle sebe vyskytuje jak číselný, tak i slovní formát citace) jednoduše kopírovány z různých zdrojů.

V popisu metodik opět zcela nekonzistentně je na začátku nekompletní seznam použitých chemikálií a přístrojů, u některých je uveden výrobce i se sídelním městem, jinde je uveden jen stát. Některé chemikálie zde uvedeny nejsou, jejich výrobce je někdy, opět nekonzistentně, uveden v textu). V seznamu roztoků jsou uvedeny jen některé použité roztoky, složení jiných je v textu.

Popis metodik je zcela zmatečný, nejednoznačný a zavádějící. Někdy chybí zásadní informace např. o koncentraci, chybí metodika barvení proteinů na gelu (str. 58), popis statistického zpracování dat (použité např. pro obrázek 25) a u některých stanovení také počet biologických a technických replikátů. Chybí popis denzitometrické analýzy (uvedení, že byla zpracována běžným softwarem na zpracování obrazu je nedostatečné), naopak jsou někdy zcela zbytečně uvedeny přesné objemy nanášených roztoků nebo jsou opakovány tabulky (tabulka 17 je zcela totožná s tabulkou 18 a 5, tabulka 19 je téměř totožná s tabulkou 14) a jiné popisy.

Popis výsledků také trpí řadou faktických nepřesností v textu. U mikroskopických snímků chybí měřítko. v popisu metodik není uvedeno barvení kultury krystalovou violetí. V popisu stanovení celkového proteinu je uvedeno, že kalibrační křivka měla regresní koeficient 0,9842. Z obrázku 21 však je zřejmé, že tato hodnota je hodnota spolehlivosti proložení. Reprezentativní snímky PathScan jsou příliš malé a mají malé rozlišení na to, aby bylo možno posoudit dosažený výsledek, bez dodatečného grafu nebo tabulky výsledků je zcela nemožné jejich hodnocení. V popisu stanovení p38 je uvedena expozice 100 Gy, která ale na reprezentativních snímcích vůbec není. Na obrázku 35 jsou imunobloty velmi nekvalitní, není vidět skoro žádný protein. Vyhodnocení je pravděpodobně zcela nemožné jediným závěrem může být, že je nutné optimalizovat koncentraci protilátek nebo nanášku proteinu.

V případě p53 jsou závěry uvedené v textu v rozporu s předloženými snímky. Stejně tak v případě fosforylované formy p44/42 a obrázku 42.

Kapitola 4.7.5 má nadpis p53 protein, ale v textu je popisován protein p44/42

V popisu obrázků reprezentativních imunoblotů v kapitole 4.7 je uvedeno, že beta-aktin sloužil jako pozitivní kontrola. Běžně se tento protein používá pro normalizaci vyhodnocení na skutečnou nanášku na gel.

Hlavní částí závěrů, vyvozovaných v diskuzi, je kvantitativní hodnocení množství vybraných signálních molekul pomocí imunodetekce po SDS-PAGE a Western-blotu. Nicméně ve výsledcích jsou uvedeny pouze reprezentativní obrázky ze tří biologických replikátů. Bez vyhodnocení formou tabulky nebo grafu s příslušnými hodnotami z denzitometrické analýzy normalizované na skutečnou nanášku, směrodatnou odchylkou a statistickým zpracováním ale není možné jakékoli závěry vyvozovat a následně ani diskutovat. V tabulce 20 v diskuzi jsou shrnuty výsledky imunodetekce vybraných proteinů a jsou uváděny často jednoznačné závěry, které ale nejsou podloženy jasnými daty. Zakládají se pouze na reprezentativních snímcích a v některých případech dokonce těmito snímky odporují. Z předložených dat tedy podle mého názoru v žádném případě nelze odvozovat závěry popsané v diskuzi.

Nicméně přes všechny nedostatky a moje připomínky je práce svým rozsahem, především experimentálním, vyjimečná a proto ji doporučuji k obhajobě.

Dotazy a připomínky:

1. Imunosupresi jste u fibroblastů indukovali ionizujícím zářením, ale z výsledků cytokinové analýzy, která jako jediná z použitých metod mohla poukázat na imunosupresi, nejsou patrné žádné změny. Tedy je možné, že k imunosuprese nebylo vůbec dosaženo. V popisu cytokinové analýzy také uvádíte, že změny cytokinů jsou pozorovány v supernatantu

buněčné kultury, stanovovali jste tyto cytokiny v buněčném médiu, nebo (jak popisujete) v buněčném lyzátu?

2. Jak by se dala imunosuprese u těchto buněk spolehlivě stanovit?

3. Dala by se imunosuprese navodit i jinak než ionizujícím zářením?

4. Z popisu metodik práce s buněčnou linií MRC-5 se jeví, že jste pro experiment buňky vždy znovu rozmrazili. Je tomu skutečně tak?

5. Také popisujete, že jste při pasážování k buňkám napipetovali asi 2 ml PBS pro promytí neuniformních buněk. To je velmi neobvyklé slovní spojení. Můžete to nějak blíže vysvětlit?

6. Jakým způsobem se kaspázy podílejí na regulaci buněčného cyklu?

7. Při imunodetekci kaspáz jste používali protilátky proti aktivní (štěpené formě) nebo proti celkovému proteinu?

Celkové hodnocení, práce je: velmi dobrá, k obhajobě: doporučuji

V Hradci králové dne 5. 6. 2018

.....
podpis oponentky / oponenta