

Posudek na diplomovou práci

školitelský posudek

Jméno školitele: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

oponentský posudek

Datum: 5. 9. 2017

Autor:

Bc. Tereza Prokopová

Název práce:

In vitro test buněčné imunitní odpovědi pro diagnostiku Lymeské boreliózy

Zadané cíle práce, včetně tématu literárního přehledu:

Cílem této diplomové práce bylo testování genetické variability virulentních faktorů ze sběrů lokálních kmenů *Borrelia* spp., a to novým způsobem digitální „droplet“ PCR (ddPCR). Následně v druhém roce měl být provedený in vitro testu buněčné imunitní odpovědi na principu degranulace ve vzorcích plně krve pacientů s akutní formou Lymeské boreliózy, včetně srovnání se serologickým vyšetřením pacientů, které jsou prováděné na klinických pracovištích.

Cíle, které si následně zvolila Tereza Prokopová pro sepsání své diplomové práce pokrývají hlavně první rok původního plánu, tedy PCR-založenou detekci borelií:

1. Metodou digital droplet PCR (ddPCR) detekovat boreliovou DNA v klišťatě gDNA.
2. Detekovat borelie v klišťatech z lokálního sběru PCR metodou.
3. Prokázat koinfekci klišťat boreliemi metodou ddPCR pomocí primerů navržených pro 16S rRNA specifických pro 3 druhy borelií.
4. Stanovit detekční limit ddPCR pro záchyt boreliové DNA v gDNA pocházející z klišťat.
5. Vizualizovat nukleotidovou konzervovanost pro geny vybraných virulentních faktorů (VF).
6. Navrhnout primery pro amplifikaci VF OspA a OspC tak, aby nasedaly na konzervované úseky genů a amplikon zahrnoval variabilní úseky genů.
7. Následně pomocí sekvenace PCR produktu, vzniklého reakcí s nově navrženými primery, zmonitorovat nukleotidovou variabilitu VF OspA a OspC.
8. Metodou průtokové cytometrie sledovat aktivaci imunitních buněk vyvolanou boreliovými VF.

Téma řešerše je zaměřené na otázku jak variabilita patogenů z komplexu Bbsl ovlivňuje reakci hostitele a zda je důležitá pro klinickou diagnostiku, konkrétně pro buněčnou odpověď hostitele proti boreliím jako jednoho z modelů na školitelském pracovišti.

Splnění cílů diplomové práce:

Tereza Prokopová v prvním roce úspěšně zavedla techniku ddPCR a analyzovala část vzorků z lokálních sběrů klišťat i kontrolními metodami PCR (1 experiment) a qPCR (1 experiment). Celkový souhrn a porovnání těchto metod vzhledem k jejich citlivosti a specifitě již nedokončila. Provedla bioinformatickou analýzu dvou virulentních faktorů OspA a OspC z dostupných dat v Genbank a navrhla primery do konzervovaných částí genů pro amplifikaci variabilní části, ale dále již nepracovala na sekvenování těchto faktorů z lokálních sběrů. Kvalitním výsledkem v polovině studia byl její podíl na publikaci ddPCR dat ve spolupráci s americkými partnery (Adam Bemis, BioRad) ve formě posteru na ASM Microbe 2016 konferenci v Bostonu, U.S.A.

V druhém roce provádění diplomové práce se Tereza Prokopová měla za úkol věnovat testování dostupných patientských vzorků krve, ale nepřekročila počáteční negativní výsledky a nebyla schopná aktivním přístupem dopracovat tuto hlavní část své práce. Následně jsme proto původní cíle zúžili pro sepsání diplomové práce především na základě PCR analýzy borelií. V souhrnu nebyly ani tyto snížené cíle splněné bez výhrad školitele.

Přístup studenta k práci s literaturou:

U Terezy Prokopové se projevily nedostatky, které souvisí se schopností dohledávat a diskutovat primární zdroje, relevantní zvoleným cílům studia. Tento stav trval až do konce sepisování diplomové práce. Práce sice obsahuje nadměrný počet 143 citací, ale jen velice malá část souvisí s otázkami, které si studentka klade. Úvod diplomové práce je v důsledku příliš obecný a není možné na něj navázat kvalitní diskuzí.

Například v klíčové otázce použití ddPCR metody pro detekci variability a vzácného výskytu borelií a jiných mikrobů v patientských vzorcích cituje jedinou práci (King *et al.*), a to ještě v jiném kontextu. Toto je moje hlavní výhrada k práci na diplomové práci vzhledem k tomu, že schopnost diskuze vlastních dat s publikovanými je základní dovedností absolventa.

Konzultacemi a opravami předložené práce jsem strávil mnohem více času než je obvyklé a přesto v jednotlivých verzích nebyl patrný zásadní pokrok, ani v samém závěru sepisování diplomové práce. Bohužel musím konstatovat, že kvalita práce s literaturou byla velice špatná.

Přístup studenta k práci v laboratoři:

Tereza Prokopová pracovala v mé laboratoři od počátku svého magisterského studia. Během svého působení spolupracovala se dvěma studenty Erasmus+ a mohla tak zakusit i formu vedení malých projektů.

Během prvního roku úspěšně zavedla ddPCR metodu a získaná data následně zveřejnila ve formě posteru na mezinárodní konferenci. Na tento úspěch nicméně ve druhém roce nenavázala a počet provedených experimentů i jejich kvalita byl velice podprůměrný. Aktivita z její strany byla nízká.

Tereze nejvíce chyběly schopnost dokončovat práci a poučit se z vlastních chyb. Z mých nároků na diplomovou práci jsem slevil, ale Tereza toho nevyužila, naopak ještě více polevila. Po zapsání kreditu za diplomovou práci s tím, že během následujících tří měsíců provede experimenty pro zdárné ukončení studia, se již v laboratoři neobjevila.

Přístup studenta při sepisování práce:

Tereza Prokopová byla rozhodně schopná ve vyhledávání obecných zdrojů k širokému tématu Lymeské boreliózy, které jí zajímá. Ovšem z vědeckého pohledu je kritická schopnost diskuze vlastních výsledků s literaturou a zde byla její aktivita podprůměrná. Stejně jako měla tendenci k vysoké kvantitě počtu citací nad jejich kvalitou, Tereza sepsala neuvěřitelných 57 verzí diplomové práce. Právě schopnost posoudit kvalitu je ovšem tou dovedností, se kterou má magisterský student opouštět univerzitu. Celý postup práce byl zakončený zásadním přeformulováním celé práce na úplném konci jejího sepisování, a to se zákonitě promítlo do špatné kvality.

Splnění nároků na diplomovou práci a celkové hodnocení:

Zadané cíle diplomové práce byly splněné pouze okrajově, spokojený jsem pouze s provedením ddPCR experimentů, méně již s jejich interpretací a srovnáním s literaturou. Doporučuji Tereze Prokopové přepsání diplomové práce s jednoduchým cílem správně diskutovat dosažené výsledky s literaturou a její obhajobu v následujícím termínu.

Předloženou diplomovou práci nedoporučuji podstoupit k obhajobě a navrhuji ohodnotit stupněm „nevyhověla“.

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis školitele:

