

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Michala Černého na
téma **Screening kandidátních genů karcinomu prostaty.**

Předložená práce spočívá ve srovnání relativní exprese 3 genů – SHB, POSTN a HPN, o kterých se uvažuje jako o možných biomarkerech karcinomu prostaty. Je psána srozumitelně a potěšilo mě, že autor dobře zvládá český jazyk – jak po stránce pravopisu, tak zejména po stránce syntaxe.

Z formálního hlediska nemám k práci větší výhrady. Je rozdělena na 11 oddílů, které respektují obvyklé členění. Obsah je zpracován pečlivě a velmi podrobné značení oddílů umožňuje dobrou orientaci v textu. Tabulky a grafy jsou jasně popsány a číslovány, na většinu z nich ale chybí odkaz z textu. Mně to nedělalo problémy, jelikož jsou tyto objekty vždy řazeny do konkrétního místa; odkazy ale doporučuji. U několika citací v textu, které mají více autorů, je uveden jen první autor a chybí „et al.“.

V úvodních oddílech Bc. Michal Černý podrobně a přesto srozumitelně seznamuje s problematikou karcinomu prostaty – přináší klinická i epidemiologická data, zaměřuje se na diagnostické a prognostické markery a popisuje aktuální stav vědomostí o genech SHB, POST a HPN. Mám jen jednu otázku – *na str. 5 popisujete rozdíly v délce a opakování CAG tripletu androgenního receptoru. Je mezi tím rozdíl? Na dvou místech je použité slovo „molekulární“ (molekulární úroveň, molekulární rozbor) ve významu „molekulárně genetický“, což molekulární genetici často dělávají.*

V oddíle Materiál a metodika jsou uvedeny použité metody a charakteristika vyšetřované skupiny. Podmínky centrifugace jsou bohužel označeny v otáčkách za minutu bez specifikace centrifugy a rotoru – tomu se lze snadno vyhnout používáním RCF. *Na kolika vzorcích proběhla optimalizace annealingové teploty? Na jakém cycleru jste celý experiment prováděl? Proč nebyla použita PCR v reálném čase, odstranila by se variabilita způsobená rozdílným pipetováním cílového a referenčního genu (přepokládám, že PCR cílového a referenčního genu probíhala v oddělených zkumavkách)? Také se mohla do výpočtu zahrnout rozdílná účinnost PCR (mezi cílovým i ref. genem i mezi jednotlivými vzorky). Proč byl jako referenční gen zvolen GAD?*

V kapitole Výsledky jsou stručně uvedena dosažená měření s důrazem na statistické hodnocení dat. Jen bych doporučil umístit rekapitulaci vyšetřovaného souboru pacientů hned na začátek. Rozdělení vzorků s karcinomem a benigní hyperplázií se dozvídáme až na začátku odstavce věnovanému periostinu, rozdělení stadií karcinomu ještě dále, ačkoliv se jedná o vlastnost populace platnou pro veškeré experimenty.

V Diskusi autor shrnuje výsledky, srovnává je s citovanými pracemi, klade si otázky a definuje další možné postupy. Zde mám dvě poznámky: Vyvarujte se oblíbené chyby hodnotit svá data souhlasně s citovanými pracemi. Když Vám rozdíl výjde statisticky nevýznamný, tak tam prostě není, i když to vyšlo „nepatrně nižší...“ a bylo by to shodné s citací.

Závěr je stručným shrnutím, následuje Seznam použitých zkratk. 73 citovaných prací je dostatečným odborným základem, většina je z posledních tří let. Z přílohy je navíc vidět, že práce byla dvakrát přednesena na odborné konferenci.

Práce Bc. Michala Černého hodnotím kladně. Přes drobné výtky a otázky (které často směřovali spíše k designu experimentu, který autor musel přijmout) je práce dobře napsaná, aktuální a určitě má své místo v širokém poli hledání markerů pro lepší diagnostiku a prognózu nádorových onemocnění. Práci doporučuji k obhajobě.



Ondřej Scheinost

Strakonice, 30. května 2010

Posudek oponenta

Diplomová práce Michala Černého „Screening kandidátních genů karcinomu prostaty“

Michal Černý se ve své diplomové práci zabýval aktuální problematikou: hledáním nových časných markerů karcinomu prostaty, využitelných v medicínské praxi. Cílem práce bylo shromáždit klinická data a biologický materiál u co největšího souboru nemocných s karcinomem prostaty, zavést a optimalizovat analýzu exprese genů *SHB*, *POSTN* a *HPN* v bioptických vzorcích tkáně karcinomu prostaty, analyzovat expresi uvedených genů a zhodnotit korelace exprese s vybranými klinickými parametry.

Teoretickou znalost problematiky prokázal diplomant v 26 stran dlouhém úvodu, shrnujícím aktuální epidemiologická data, rizikové faktory karcinomu prostaty, klinické symptomy, diagnostiku a terapii karcinomu prostaty. Dále popsal v současnosti známé molekulární mechanismy vzniku nádorů a charakterizoval vybrané kandidátní geny. Vyšetřovaný soubor nemocných, použité laboratorní a statistické metody jsou popsány na 8 stranách, výsledky jsou shrnuty na 6 stranách do 15 grafů a diskutovány na 5 stranách textu. Práce je doplněna 70 citacemi.

K práci mám tyto připomínky:

1. Pacienti s karcinomem prostaty (46 osob) i pacienti s benigní hyperplazií prostaty (21 osob) jsou uvedeni ve smíšené tabulce (5-1), přitom pacienti s BHP byli použiti jako kontrolní soubor. Pro přehlednost by bylo vhodné obě skupiny uvést samostatně.
2. Pokud byly primery pro RT-PCR převzaty z literatury (str. 31), je vhodné uvést původní autory, např. v Tabulce 5.2. Snad jen nedopatřením jsou v tabulce 5.2 jako primery pro *POSTN* uvedeny primery, jejichž sekvence odpovídá genu *KIF27* na chromosomu 9q21. U primerů navržených autorem práce by bylo vhodné uvést podrobnější popis navrženého systému.

3. Standardní způsob popisu složení reakční směsi pro PCR uvádí buď výslednou koncentraci komponenty v reakci (dNTP), nebo absolutní množství (templátová mRNA, primery); uvést objem, byť s uvedením dodavatele kitu, nestačí (Tabulka 5-3 na straně 32).

4. Autor uvádí na str. 34, že „důležitým krokem analýzy genové exprese je výběr vhodného referenčního genu“ a dále uvádí, že byl zvolen gen *GAD*. *GAD* je přitom označení pro gen pro glutamát dekarboxylasu, nikoliv pro glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu, jehož označení je *GAPDH* (*GAPD*). Souhlasím s autorem, že výběr referenčního genu je velmi významný a uvítala bych podrobnější odůvodnění, proč byl jako referenční gen zvolen gen *GAPDH*. Některé starší publikace jeho vhodnost zpochybňují (*Zhong H, Simons JW, Biochem Biophys Res Commun 259:523-526, 1999; Salnikow K et al, Cancer Res 60: 5630-5634, 2000*).

Přes výše uvedené připomínky závěrem konstatuji, že Michal Černý prokázal schopnost práce s odbornou literaturou, sběru dat i biologického materiálu, zvládl řadu laboratorních metod, samostatnou prací získal experimentální data, tato statisticky vyhodnotil a výsledky diskutoval v kontextu současných poznatků ve studované oblasti. Předložená práce vyhovuje nárokům kladeným na diplomovou práci, doporučuji jí k obhajobě a hodnotím ji klasifikačním stupněm **velmi dobře**.

V Praze dne 30. 5. 2010



MUDr. Anna Křepelová, CSc

Ústav biologie a lékařské genetiky LF2. UK a FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
anna.krepelova@fnmotol.cz