



OPONENTSKÝ POSUDEK

na magisterskou diplomovou práci Daniely Šantové

Analýza mutačního stavu IgVh genu u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií

Jedním z předpokladů úspěšné léčby chronické lymfatické leukémie (CLL) je kromě včasné diagnózy tohoto maligního onemocnění analýzy i správně zjištění stupně a prognózy vývoje onemocnění. Diplomantka se ve své práci zabývala jedním z perspektivních prognostických kritérií CLL, tj. stanovením mutačního stavu variabilního segmentu těžkého řetězce imunoglobulinových genů, označovaného jako IgVH. Hlavním cílem její práce bylo na základě molekulární analýzy IgVH u pacientů s diagnózou CLL definovat vztah mezi mutačním stavem a klinickým vývojem pacienta a ověřit tak prognostický potenciál této metody. Řešená problematika je tak nepochybně velmi aktuální a její úspěšné zpracování by mohlo mít přímý dopad na klinickou praxi.

Celá problematika CLL včetně příčin a diagnostiky onemocnění, prognostických faktorů a jejich dopadů na léčbu, struktury a funkce rodiny imunoglobulinových genů a mechanismu jejich přestavby je detailně a až na drobné formální nedostatky (viz níže) pečlivě zpracována na 22 stranách v devíti úvodních kapitolách literárního přehledu. K této části mám jen jednu otázku.

V kap. 5. je uvedeno, že nejčastější chromosomální aberací pacientů s CLL je trizomie chromosomu 12, avšak v kap. 6.2.1.1. je jako nejčastější uvedena ztráta či translokace části dlouhého raménka chromosomu 13. Jak to tedy je?

Po přečtení devíti úvodních kapitol jsem se velmi těšil na hlavní část diplomové práce, zabývající se vlastní experimenty diplomantky. A tady přišlo velké zklamání, neboť další kapitoly jsou zpracovány způsobem, který prakticky znemožňuje pochopit čtenáři, co a proč bylo děláno a zjištěno a jaké z toho plynou důsledky či jaký je přínos práce. Nejzávažnější nedostatky shrnuji v několika bodech.

(1) V kap. 10. jsou cíle práce formulovány v bodech, zřejmě opsaných ze zadávacího protokolu. S tím se bohužel setkávám ve studentských pracích často. Studenti by se měli pokusit cíle práce formulovat souvislým textem spolu se zdůvodněním, proč byly tyto cíle stanoveny.

(2) Kap. 11. (Materiál a metody) je psána v bodech jako laboratorní pracovní protokol, navíc je smíchána čeština s angličtinou (např. viz „pipetovat přímo do QIAshredder spin column s 2ml collection tube“, Wash I, atd.). Tato kapitola by měla být psána jako souvislý text včetně sdělení, k čemu byla daná metoda použita. Detailní popis protokolu v bodech je pak možné uvést v příloze. Zcela postrádám sdělení, odkud byly brány vzorky krve či komu byla krev odebrána.

(3) Kap. 12. (Výsledky) nelze hodnotit. Tato hlavní část diplomové práce začíná nadpisem „Pacienti vyšetření v naší laboratoři“ a třístránkovou tabulkou, která je zřejmě výčtem pacientů uvedených pod kódy a s nějakými dalšími údaji (asi věk, pohlaví, nějaké hodnoty) – tabulka je jen obtížně srozumitelná, neboť nemá žádnou legendu, dokonce ani nadpisy sloupců. Poté následuje „Metodika stanovení mutačního statusu (má být stavu nebo statutu) variabilního segmentu těžkého řetězce imunoglobulinů“, tedy část, která rozhodně měla být součástí předchozí kapitoly. Kromě toho jsou v ní podivné formulace jako např. „Po přečištění tohoto specifického fragmentu dochází k jeho sekvenaci ...“.

Další část výsledků („Identifikace rodin těžkých řetězců imunoglobulinových genů podle výsledků elektroforézy“) je uvedena formou obrázků gelů proložených body bez jakéhokoliv

souvislého textu. Další část výsledků („Výsledky fragmentační analýzy“) je tvořena vloženými výstupy z programu „GeneScan“ a výstupy ze sekvenátoru formou „copy & paste“. Výsledková část končí nadpisem „Zhodnocení výsledků naší laboratoře“, pod kterým jsou vloženy čtyři barevné grafy bez jediného popisu.

(4) V kap. 13. (Diskuse) jsou na prvních třech stranách do značné míry uvedeny informace, které již byly prezentovány v úvodních kapitolách literárního přehledu. Teprve na čtvrté a páté straně diskuse jsem se dozvěděl, že byl v této práci vyhodnocen mutační status B-CLL u více než 200 pacientů, co u nich vlastně bylo zjištěno a též asi nejpodstatnější výstup této diplomové práce, že mutační stav genů pro těžké řetězce imunoglobulinů koreluje s průběhem nemoci a mohl by se tudíž stát univerzálním markerem pro klinickou praxi. Pouze tyto poslední dvě strany splňují moje představy, jak má vypadat diskuze diplomové práce.

(5) Zcela chybí závěrečná kapitola – Souhrn.

K formálnímu zpracování práce mám dále řadu drobných připomínek:

- V práci zcela chybí stránkování; v obsahu měly být uvedeny odkazy na příslušné stránky.
- V celém textu je chybně psáno slovo „chromozom“; správně je buď chromosom nebo chromozóm.
- Zkratky genů se obvykle píše kurzívou.
- Obr. 1 – popisky obrázku převzatého z literatury jsou anglicky; v seznamu literatury chybí citovaná práce Janeway (2001).
- Obr. 2 – opět popisky obrázku převzatého z literatury jsou anglicky; chybí odkaz na zdroj obrázku.
- Práce Stevenson et Caligaris-Cappio (2008) v kap. 4. chybí v seznamu literatury.
- Kap. 6.1.1. – v textu chybí odkazy na tabulky klinické klasifikace B-CLL podle Raie a Bineta, u tabulek chybí označení Tabulka 1, respektive Tabulka 2.
- Kap. 6.1.2. – v textu je zde i na dalších místech citována práce Hallek et al. (2008), v seznamu literatury je však uvedena pouze práce Hallek (2008); pokud je v závorkách uvedeno více citací, měly by být citovány chronologicky; místo citace Molica et al. (1987) má být Molica et Alberti (1987).
- Kap. 6.2.2. – raný/rané se píše s jedním „n“.
- V kap. 6.2.3.2. je chybně citován Ferrarini (2006) místo Ferrarini et al. (2006).
- Práce Tinhofer et al. (2006), citovaná v kap. 6.2.3.3., chybí v seznamu literatury; též je chybně citován Oscier (2002) místo Oscier et al. (2002).
- V kap. 11.1. je 2x napsán mercaptoethanol chybně s velkým písmenem, též nejednotně psán („...ethanol“ a „...etanol“).
- V kap. 13. je několik citací kolektivních prací chybně citováno – viz např. Crespo (2003), Del Principe (2006), Ure (2009), Morabito (2009) – všechny mají být citovány formou Crespo et al. (2003).
- Citace Orchard a kol (2004) u obr. 3 v kap. 13 je uvedena jinou formou než ostatní citace a chybí v seznamu literatury.
- Kap. 14. Literatura:
 - u řady citací není dodržen jednotný styl formátování;
 - citace Adam & Vorlíček (2001) není citována v textu;
 - v citaci Damle et al. je uveden rok 199;
 - v citaci Chen & McMillan (2008) má být „Molecular“ místo „Molekular“;
 - v citaci Cook & Tomlinson (1995) chybí stránky;
 - v citaci Cordone et al. (1998) chybí název práce;
 - citace Mayer (2002) a Mayer et al. (2007) nejsou citovány v textu;
 - v citaci Panovska-Stavridis et al. (2007) je překlep (Leukemia Reseyrch) v názvu časopisu;
 - tři citace Papajík et al. (2006 část III., 2x 2007) nejsou citovány v textu;

- Příloha 1: v českém textu by měla mít české popisky; chybí legenda a sdělení, odkud obrázek převzat, popřípadě citace.
- Příloha 2: opět chybí legenda s vysvětlením a sdělení, odkud převzat obrázek, či kým pořízen.

Závěr

Z posledních dvou stránek diskuze nepřímo vyplývá, že diplomantka Daniela Šantová analyzovala mutační stav IgVH u značného množství pacientů s CLL, prokázala korelaci mezi mutačním stavem vývojem onemocnění a pravděpodobně tedy po experimentální stránce splnila vytčené cíle práce. Avšak vlastní zpracování diplomové práce má natolik závažné nedostatky, že je prakticky nemožné posoudit kvalitu provedení a přínos práce. Proto ji

nedoporučuji ji k obhajobě.

Autorce doporučuji práci přepracovat tak, aby splňovala obvyklé formální požadavky kladené na diplomové práce v experimentálních oborech na PŘF JU.



František Marec

V Českých Budějovicích, 23. května 2010

Posudek na diplomovou práci
Analýza mutačního stavu IgVh genu u pacientů
s chronickou lymfatickou leukémií

Bc. Daniela Šantavá

Hematologické malignity představují v současné době významnou skupinu onkologických onemocnění, pro jejichž diagnostiku, určování prognózy i volbu terapie jsou nezbytné moderní cytogenetické a molekulárně biologické metody.

Předložená diplomová práce Bc. D. Šantavé se zabývá analýzou mutačního stavu IgVh genu u souboru pacientů s chronickou lymfatickou leukémií. Jedná se o vysoce aktuální práci z oblasti molekulární onkologie, která upřesňuje současné poznatky o vzniku a vývoji CLL a má výrazný vztah k prognóze a tím i způsobu léčby tohoto onemocnění.

Vlastní práci můžeme rozdělit do čtyř celků. První část má za cíl předložit ucelenou teorii problematiky chronické lymfatické leukémie, je zde podrobně popsán klinický obraz, vývoj a klasifikace této choroby, autorka shrnuje prognostické faktory, jejich význam i současné metod léčby onemocnění. Tato část je velice pěkně zpracována a poskytuje dostatek informací pro následující kapitoly.

Ve druhé části, týkající se konkrétního experimentálního uspořádání, autorka podrobně popisuje molekulárně biologické experimentální přístupy, které byly použity při řešení práce. Je zřejmé, že autorka zvládla a využila celou škálu náročných molekulárně biologických technik včetně fragmentární analýzy či sekvenování.

Ve třetí, stěžejní části jsou uvedeny získané výsledky, jejichž význam autorka komentuje v následné diskuzi. Z podrobného prostudování této kapitoly vyplývá rozsah provedené práce, který překračuje požadavky kladené na práce tohoto typu. Za stěžejní považuji především poznatky o mutačním statutu genů pro těžké řetězce imunoglobulínů, které autorka získala na poměrně velickém souboru vyšetřovaných pacientů.

Práce je v závěru doplněna seznamem použité literatury čítající 61 položek a obrazovou dokumentací.

Celkově lze konstatovat, že předložená diplomová práce Daniely Šantavé splňuje formální požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Přes nespornou kvalitu práce mám však několik výhrad k formálnímu zpracování této práce, které trochu snižují její nespornou odbornou kvalitu:

1) I když je práce psána bez výraznějších překlepů a pravopisných chyb, autorka často nedodrží jednotnou terminologii odborných termínů (trizomie x trisomie, chromozóm x chromozom).

2) Domnívám se, že při klinických studiích tohoto typu je vhodné začít kapitolu Materiál a metody Souborem vyšetřovaných pacientů. Naprosto postrádám informaci odkud (z které kliniky) pocházeli vyšetřovaní pacienti, jak dlouho byli sledováni, též bylo by vhodné zde uvést základní charakteristiku souboru (muži x ženy), medián věku, stadium onemocnění atd.

3) Značné výhrady mám k formálnímu zpracování kapitoly Výsledky. Autorka zde prezentuje pouze tabulky a grafy, což je značně nepřehledné. Pokud jsou v cílech diplomové práce uvedeny 4 podcíle, měla by autorka dodržet tuto strukturu i u výsledků a vedle obrázků uvést i slovně, co bylo prokázáno. Navíc tabulky i obrázky jsou bez nadpisu, nejsou očíslované a popis je nedostatečný. V této formě by jistě tak zajímavé výsledky nemohly být publikovány. To vše stěžuje pochopení výsledků. Bylo by též vhodné uvést zdroj, ze kterého byl převzat obrázek Příloha 1.

4) V kapitole diskuze autorka rozebírá význam prognostických markerů, některé věci se opakují z úvodu, postrádám ale větší srovnání údajů prezentovaných v této práci s podobnými studii provedenými na souborech pacientů s CLL ve světě. Může autorka srovnat počty pacientů s mutovanou a nemutovanou formou s jinými světovými studii?

Na závěr mám jednu otázku do diskuze: Autorka píše ve své práci o negativním prognostickém významu delece 17p. Může dojít k inaktivaci genu p53 u pacientů s CLL i jinými mechanizmy než delecí?

Závěr:

S ohledem na autorkou dosažené kvalitní experimentální výsledky, avšak určité formální nedostatky ve zpracování této diplomové práce navrhuji známku B.

V Brně 20.5. 2010


doc. RNDr. Petr Kuglík, CSc.

ÚEB, Přírodovědecká fakulta MU v Brně