

Oponentský posudek

Bc. Eva Suchanová: Studium vlivu Sericinových proteinů a jejich derivátů na hmyzí a savčí buňky

Ve své práci se autorka zabývala velmi zajímavým tématem s možnými praktickými aplikacemi pro tkáňové kultury. Byl sledován vliv pěti různých koncentrací komerčního sericinového hydrolyzátu na proliferaci sedmi savčích buněčných linií a jejich viabilitu po rozmrazení. Dosažené výsledky bohužel do značné míry znehodnocuje řada formálních nedostatků.

V úvodní části práce autorka shrnula obecné poznatky o hedvábí a jeho využití až po molekulárně biologická fakta o genech kódujících jednotlivé komponenty hedvábí a jejich translačních produktech. S ohledem na téma práce je podrobnější pozornost věnována sericinům, jejich využití v biotechnologiích a tkáňovým kulturám. Této části práce by podle mého názoru prospělo přehodnotit řazení kapitol, zařazení údajů do jednotlivých kapitol a odstranění zbytečných redundancí v textu. Např. údaj o složení hedvábí a molekulových hmotnostech jednotlivých komponent je uveden na úvod kapitoly 1.1.2.1 Složení hedvábí i 1.1.2.2 Komponenty hedvábí. Kapitola 1.1.4 Použití hedvábí obsahuje data o sericinových genech, které nijak nesouvisí s využitím hedvábí a nabízí se jejich zařazení do následující kapitoly Sericiny. V kapitole tkáňové kultury je velká pozornost věnována buněčným kulturám z poikilotermů, i když autorka s těmito liniemi vůbec nepracovala a naopak chybí rozdělení na buněčné linie a primární kultury, i když oba typy kultur autorka používá pro testování vlivu sericinu na buněčné dělení. Obrázky v této části práce nemají popisy a není na ně odkazováno v textu.

Cíle práce by si zasloužily být uvedeny na samostatné stránce. Cíle obsahují i testování na hmyzích buňkách, které není dále zmiňováno, bylo by tedy lepší toto vypustit.

V části metodika je uvedeno mnoho teoretických informací o použitých buněčných kulturách a chemikáliích, které by bylo lépe zařadit do úvodního literárního přehledu nebo zcela vypustit. Naopak popis metodik je v některých případech zmatečný a neúplný.

Výsledky jsou podány formou grafů s podrobnými popisky. Z popisu grafů ani z popisu scratch testu v kapitole Materiál a metodika nevyplývá, jaká data jsou zobrazena v grafech. Prosím autorku o vysvětlení.

Diskuse znovu obšírně shrnuje výsledky autorčiny práce a do značné míry se tak kryje s předchozí kapitolou. Porovnání výsledků autorky s literaturou je nedostatečné a omezuje se prakticky pouze na jeden odstavec na konci strany 41. V celé diskusi jsou uvedeny pouze dvě citace!

Závěr práce ve dvou větách znovu opakuje, co autorka dělala bez jakéhokoli shrnutí výsledků, ke kterým svou práci došla.

Kromě již zmíněného mám k práci následující dotazy a připomínky:

1. Na jakém základě byly zvoleny buněčné linie pro testování?
2. Na jakém základě byly zvoleny koncentrace sericinu přidávané do média?
3. V přehledu pomůcek pro práci s tkáňovými kulturami by bylo vhodné uvést, že byly sterilní.
4. V oddílu materiál a metody není uveden zdroj lidské kůže pro izolaci primárních keratinocytů. Jak byly ošetřeny etické aspekty práce s lidským materiálem?
5. V popisu izolace keratinocytů z lidské kůže autorka na jednom místě mluví o „inkubaci dermis“ a „zkumavce se směsí fibroblastů a endoteliálních buněk“,

- izolovala tedy autorka fibroblasty i keratinocyty. Z textu metod nevyplývá, jak byly získány fibroblasty použité k pokusům.
6. Na straně 21 autorka uvádí, že „trypsin může na buňky působit pouze krátký čas (>60 sekund)“, údaj v závorce je zřejmě špatně.
 7. Popis barvení buněk trypanovou modří by měl být uveden při první zmínce o tomto barvení nebo by měla být uvedena alespoň poznámka, na jakém místě práce je metoda popsána.
 8. Grafy by měly být uvedeny s českými popisy.
 9. Bylo by vhodné doplnit statistické vyhodnocení dat.
 10. U grafu č. 2 jsou uvedeny fotografie kontrolního média s FBS, média bez FBS a média se sericinem, u grafu č. 3 kontrola bez FBS pro porovnání vlivu sericinu překvapivě chybí.
 11. V kapitole 4.2 Efekt sericinu na zamražené buňky jsou uvedeny přídavky sericinu v μ l. Proč nejsou uvedeny podobně jako předešlé výsledky v koncentračních jednotkách? Podobně by bylo lepší pro porovnání množství buněk po rozmražení použít procenta než absolutní počty buněk, kromě toho vyjádření „O dva stotisíce méně...“ je velmi neobratné.
 12. Český ekvivalent scratch testu je v kapitolách Materiál a metody a Diskuse uveden rozdílně.
 13. Nerozumím vyjádření na str. 42 v kapitole Diskuse: „V jamkách, ve kterých je místo FCS sericin, rostou buňky dobře v koncentraci 0,05 %, ale rychlost dělení je srovnatelná s negativní kontrolou. V koncentracích 0,01 % a 0,05 % je rychlost dělení pomalá.“ Rostou tedy buňky dobře nebo pomalu?
 14. Prosím o vysvětlení nesrovnalosti v kapitole 5.1 Účinek sericinu na zamražené buňky: „U linie HaCaT bylo po rozmraženínejvíce buněk ve zkumavce, kam byl předtím přidán 1 μ l sericinu,a nejméně buněk bylo v médiu s 5 μ l přidaného sericinu, nejméně buněk bylo ve zkumavce s 10 μ l přidaného sericinu ...“
 15. Autorka někdy používá sericinové proteiny, jindy Sericinové proteiny a někdy sericin.
 16. Práce obsahuje mnoho dalších jazykových chyb, které již jednotlivě neuvádím. Zarážející je především počet chyb v interpunkci a gramatice. V práci jsem našla minimálně třináct chyb v psaní i/y!

Práce bezesporu přinesla zajímavé výsledky o vlivu sericinových derivátů na savčí buňky. Rozsah metod i výsledků je zcela postačující pro magisterskou práci, bohužel autorka nezvládla prezentaci výsledků a vzhledem k množství formálních nedostatků doporučuji předloženou magisterskou diplomovou práci k obhajobě s hodnocením dobře.

V Českých Budějovicích 16. 5. 2011


Jana Fleischmannová



BIOLOGICKÉ CENTRUM Akademie věd České republiky, v.v.i.

Parazitologický ústav

Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika
Telefon 38-777 5403; Fax 00420-38-53 10 388

Oponentský posudek na magisterskou práci „Studium vlivu sericinových proteinů a jejich derivátů na hmyzí a savčí buňky.“

Student: Bc. Eva Suchanová

Vedoucí práce: Mgr. Robert Fedič, Ph.D.

Studentka Bc. Eva Suchanová předkládá k obhajobě na katedře fyziologie živočichů PřF JU magisterskou práci, která se zabývá studiem vlivu sericinových proteinů a jejich derivátů na hmyzí a savčí buňky. Zadání práce vychází z publikace *Terada et al., 2002, Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. Cytotechnology 40(1-3):3-12.*, která popisuje proliferaci savčích buněk kultivovaných v nepřítomnosti séra, jen na základě použití média obohaceného o látku sericin. Sérum se ke kultivačnímu médiu přidává z toho důvodu, že obsahuje řadu makromolekul, které mohou být pro danou buněčnou linii esenciální či semiesenciální, ale nejsou známy, a proto nemohou být součástí chemicky definovaného média. V případě některých aplikací je ale nutno se použití séra v buněčné kultuře vyhnout. Pak se volí alternativní látky, například bovinní sérový albumin, který je dostupný i v rekombinantní podobě. Ovšem nahrazení séra jiným suplementem může vést k tomu, že buňky nebudou v plné míře metabolicky aktivní a mohou nastartovat různé patofyziologické procesy. V současné době jsou ale již komerčně dostupná růstová a udržovací média umožňující bezsérovou kultivaci buněk i bez narušení jejich fyziologického stavu. Předkládaná magisterská práce si klade za cíl nalézt v podobě látky sericinu další alternativu pro bezsérovou kultivaci buněk *in vitro*.

Předložená práce sestává z 53 stran textu a je členěna standardním způsobem (Úvod a literární přehled, Cíle práce, Materiál a metodika, Výsledky, Diskuse, Závěr, Použitá literatura).

Úvod a literární přehled začíná pěkně napsaným a čtivým přehledem o historii hedvábí a hedvábnictví. Dobrý dojem z této části však kazí často se vyskytující chyby ve shodě podmětu s přísudkem (bohužel i v dalších částech práce). Poněkud slabší je část 1.2 Tkáňové kultury. V rámci této části se autorka věnuje spoustě nedůležitých detailů (například že „zebříčka získá sexuální zralost ve 3 měsících a samice každý týden vyprodukuje 100-200 vajíček“), zatímco jiné podstatně důležitější údaje chybí. Například zde není vůbec vysvětlen rozdíl mezi primární kulturou a imortalizovanou linií, způsoby imortalizace, není zmíněna možnost kultivace buněk *ex vivo* apod.

V části **Materiál a metodika** autorka zbytečně obsáhle popisuje nepříliš důležité či notoricky známé údaje. Například pojednání o látce trypsin, která byla použita při pasážování buněk, či popis toho, co je to PBS, zabírají dohromady dvě třetiny stránky a to pokládám za zbytečné. Současně citování wikipedie není v tomto případě příliš šťastné. Popisy historie jednotlivých

buněčných linií bylo možno nahradit odkazem na příslušnou literaturu. Odstavec pojednávající o *Helacyton gartleri* není moc srozumitelný. Místo výrazu „nelidské množství chromozómů“ bych doporučil užít např. termínu „aneuploidie“. V případě izolace keratinocytů z lidské kůže není uvedeno, jakým způsobem byla kůže získána a z jakých částí těla. Proč je chemické složení médií uvedeno v oddíle „Sérum“ a nikoliv v části „Růstové médium“? Popisky tabulek by měly být uvedeny nad tabulkou, nikoliv pod ní. V česky psaném textu není vhodné užívat pro bovinní fetální sérum anglickou zkratku FCS, ale BOFES. Popisy pracovního postupu v podobě „Na mikropipetu nasadíme žlutou špičku...“ (str. 26), „Podle záznamové knihy v laboratoři si nalezneme, v kterém stojanu jsou v mrazáku uloženy buňky...“ (str. 30) nebo rozpis pomůcek včetně „kádinek na odpad“ (str. 28) do tohoto typu prací nepatří. Možná, že jsem tento údaj přehlédl, ale v celé práci nemohu najít údaj o koncentraci séra v jednotlivých kultivačních médiích užívaných při experimentech. Buňky se neuchovávají v „mrazáku o teplotě -152°C“ (str. 30), nýbrž v tekutém dusíku.

Kapitola **Výsledky** shrnuje v podobě sloupcových grafů výsledky autorčiných pozorování a několik mikrofotografií. Bohužel celá kapitola sestává jen z uvedených grafů a obrázků a popisků k nim a postrádá jakýkoliv další doprovodný text. Výsledky podle všeho nebyly statisticky zpracovány, což pokládám za nedostatek závažného rázu. Z grafů není jasné, co označují procenta na ose-y. Některé z grafů kombinují anglické popisky s českou legendou, jiné jsou kompletně v angličtině. Troufám si tvrdit, že některé z výsledků, které autorka komentuje jako pozorovaný efekt, by vzhledem k velikosti směrodatných odchylek nebyly po provedení statistické analýzy shledány jako signifikantní (např. v grafu 3 nebo 8).

V kapitole **Diskuse** představuje téměř veškerý text pouze popis výsledků, který měl být uveden v části Výsledky a nikoliv v Diskusi. Celá tato kapitola až na jeden odstavec diskusí není. U tohoto typu prací má diskuse dát do vztahu vlastní výsledky studenta s existujícími daty v literatuře. V tomto případě ale v celé kapitole diskuse najdeme pouhé dva odkazy na literaturu.

Seznam použité literatury obsahuje klasické chyby, jako nejednotnost citování (někde jsou uvedeny celé názvy článků, jinde zkratky), zdvojení citací apod. Zařazení internetových odkazů do seznamu literatury pod písmeno H pokládám za nevhodné.

Na autorku bych měl následující dotazy:

1. Proč nebyly výsledky statisticky vyhodnoceny?
2. V názvu i mezi cíly práce je uvedeno, že má být studován vliv sericinu na savčí a hmyzí buňky. Proč byly nakonec všechny experimenty provedeny pouze na buňkách savčích?
3. Proč nebyl mezi kontroly u pokusů s mražením buněk zahrnut i BSA? V tomto případě totiž není jasné, zda pozorovaný efekt byl dán přítomností sericinu jako takového nebo jen stabilizujícím množstvím proteinů v mrazicím médiu.
4. Není mi jasné, proč autorka neurčovala poměr živých a mrtvých buněk ihned po rozmražení materiálu a namísto toho provedla inkubaci přes víkend. Vždyť v tomto případě byly buňky, které mražení nepřežily, přerosteny rychle se dělícími živými buňkami a navíc pak ještě odmyty při trypsinizaci!

5. Jakými metodami by autorka zjišťovala, zda náhrada kultivačního séra sericinem má nějaký efekt na fyziologii buněk (například jak by se změnila genová exprese).

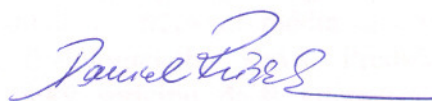
6. Z presentovaných výsledků se zdá, že sericin nemá potenciál nahradit sérum při buněčné kultivaci, ale že má možná nějaký stabilizační efekt při mražení buněk. Neuvažovala autorka o možné stabilizující aplikaci sericinu při mražení virových suspenzí?

7. Proč není v úvodu ani v diskusi pojednáno o možných jiných náhradách séra při buněčné kultivaci či obecně o problematice bezsérových médií a jejich suplementech? Mohla by tyto údaje autorka krátce komentovat?

Závěrem: Sám jsem viděl, že Eva Suchanová je pracovitou studentkou. Potkával jsem se s ní v laboratoři ve večerních hodinách i o víkendech. O to víc mne proto mrzí, že vůči předložené práci musím být poněkud kritický. Některé z chyb výše uvedených lze snad tolerovat u prací bakalářských, ale u práce magisterské je pokládám za poměrně vážný nedostatek. Mezi hlavní nedostatky řadím nesplnění všech cílů práce, neprovedení statistické analýzy a s tím spojenou nesprávnou interpretaci některých výsledků a zejména nepřítomnost odpovídající diskuse autorčiných výsledků s zahraniční literaturou.

Práci doporučuji k obhajobě, ale vzhledem k výše uvedeným výtkám ji navrhuji hodnotit stupněm

dobře.



RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

V Českých Budějovicích, 13. května 2011