



Slovní hodnocení předložené diplomové práce.

Studentka předložila k oponování rozsáhlou práci, která byla logicky členěna na všechny podstatné kapitoly (uvítal bych ještě navíc kapitolu shrnující použitý materiál a přístroje, ale není to nezbytné). Naprostá většina textu byla dobře čitelná a srozumitelná, autorka se ale nevyhnula velkému množství překlepů a občas přebývajícím či naopak chybějícím slovům. K teoretickému úvodu (kapitoly 2-8) bych měl následující připomínky:

- autorka na několika místech vycházela ze starších literárních zdrojů, jejichž tvrzení již byla vyvrácena (například *RAS* mutace se vyskytují i u karcinomu prsu či děložního čípku, výlučnost chromosomální a mikrosatelitové nestability také neplatí apod.)
- chybou je psát o počtu nemocných v roce 2013 a podložit tento údaj citací z roku 2007 (první výskyt již v úvodu a pak opětovně v textu)
- některá tvrzení by si zasloužila doplnění citace
- nekonzistence v označování genů a proteinů, které navíc neodpovídá všeobecně přijímanému doporučení (tedy, v případě lidského genu/proteinu, označovat *GEN* velkými písmeny kurzívou a *PROTEIN* velkými písmeny)
- odstavec popisující hepatocelulární karcinom se nachází v kapitole o jaterních metastázách kolorektálního karcinomu
- špatné odkázání na obrázek v kapitole 7 (místo 2 a 3 má být 4 a 5)

V kapitole 9 popisující metodické postupy chybí řada detailů. Například:

- kap. 9.1 bod 5 – jak silné řezy byly krájené?
- kap. 9.2.1 bod 3 – není vhodné udávat rychlost centrifugace v otáčkách při neznámém poloměru rotoru, vhodnější je tíhové zrychlení.
- kap. 9.3.1 bod 3 – na jaké hodnoty byla RNA ředěná?
- kap. 9.4.1 – není jasné, jaký systém pro detekci jste používali – z kontextu vyvozují, že šlo o UPL sondy, je to tak? Každopádně by bylo záhodno do diplomové práce uvést sekvence použitých primerů a délky ampliconů.
- kap. 9.4.1 – chybí informace o teplotním a časovém průběhu kvantitativního PCR

Ke kapitole 10 věnované vyhodnocení experimentálních dat, mám následující připomínky:

- u kvantitativního PCR, mi není úplně jasné schéma práce a význam jednotlivých kalibračních/normalizačních kroků – viz dotaz k autorce
- v analýze použitý Wilcoxonův párový test není vhodný pro danou strukturu dat, kdy díky přítomnosti tří porovnávaných skupin dochází k násobnému testování a tedy zvýšení pravděpodobnosti falešně pozitivních výsledků. Pro danou analýzu by bylo vhodnější použít Friedmanovu ANOVU.
- u popisu imuhostochemické analýzy zcela chybí údaje o použité protilátce, typu vyvolání signálu, způsobu odečtu dat a jejich analýzy. I přes to, že byly výsledky převzaty od dalších pracovníků, tyto údaje by v práci dle mého názoru neměly chybět.

V kapitole 11 jsou prezentována experimentálně změřená data. V podkapitole věnované deskriptivní statistice chybí popis studovaného souboru, naopak jsou v něm tabulkovou formou shrnuta data o expresní hladině jednotlivých studovaných genů, která jsou ale v této formě poměrně nepřehledná. Právě k analýze dat mám zásadní připomínku a nesouhlasím s jejím provedením. Ve chvíli, kdy autorka sleduje více referenčních genů, není možné provádět porovnání sledovaných genů ke genům referenčním systémem „jeden po druhém“. Standardním postupem je získat průměr ze všech referenčních genů a geny sledované pak porovnávat s tímto průměrem. Způsobem, jakým je analýza provedena v diplomové práci, dochází opět k mnohonásobnému testování a tím pádem růstu rizika falešně pozitivních výsledků. Výtky k deskriptivní statistice platí i pro kapitolu 11.2, kde není zřejmé, jaká data vlastně do statistických testů vstupovala. Běžně jsou výsledky expresních studií prezentovány krabicovými grafy, které by výrazně zvedly přehlednost této kapitoly. I přes značné množství statisticky signifikantních výsledků na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  nám mnohonásobné testování tuto hladinu výrazně snižuje – například použitím Bonferroniho korekce by se pohybovala na  $\alpha = 0,004$ . V kapitole 11.3 jsou pouze dva grafy bez většího vysvětlení a jejich vztah k ostatním výstupům je nejasný.

V diskuzi (kap. 12) autorka přehledným způsobem komentuje získaná data. Vhodné by bylo zmínit, zda jí studovaný soubor byl totožný se souborem analyzovaným na přítomnosti znaku CD34. Také bych se rád dozvěděl o způsobu, jak byly navrhovány primery a jak dlouhé byly cílové amplicony. V závěru práce jsou vybrány její zásadní přínosy, což je velmi dobrý a přehledný způsob prezentace výsledků. Závěry si s sebou ale nesou všechny výše zmíněné problémy, a tak lze o jejich praktickém významu spekulovat. Co mne pobavilo je v němčině psaná chybová zpráva v záhlaví od kapitoly 12 téměř do konce práce (alespoň tedy ve verzi, která mi byla předložena k oponování).

K resumé, přehledu literatury, zkratk a dalším částem práce nemám připomínky.

V souhrnu hodnotím práci jako povedenou, výsledné hodnocení ale sráží výše uvedené nedostatky. Podrobností teoretického úvodu i množstvím metodik se jedná o nadstandardní diplomovou práci, kdy autorka musela strávit dlouhou dobu v laboratoři i při vyhodnocování výsledků. Logika i ucelenost studie slibuje při podmínce revize statistické analýzy velmi pravděpodobný publikační výstup (zde určitě doporučuji konzultovat se zkušeným biostatistikem). V rámci hodnocení jsem váhal mezi velmi dobře a dobře, nakonec jsem se rozhodl pro horší známku s tím, že ji rád zlepším v průběhu obhajoby dle odpovědi na moje otázky.