Oponentní posudek dizertační práce

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Pardubice

Uchazečka: Mgr. Petra Zedníková

Název dizertační práce: Identifikace nových potenciálních biomarkerů předčasného porodu v plodové vodě

Školitel: prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.

Školitel specialista: PharmDr. Vojtěch Tambor, Ph.D.

Oponent: prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.

Pracoviště oponenta: RECAMO, Masarykův onkologický ústav, Brno

Předložená dizertační práce se zabývá problematikou předčasných porodů, které jsou v naší společnosti závažným socioekonomickým problémem. V současné době neexistují spolehlivé biochemické markery umožňující detekci předčasných porodů. Studentka pod vedením školitelů a ve spolupráci s českými i zahraničními klinickými pracovníky využila proteomické nástroje ke komparativním analýzám plodové vody žen, které porodily předčasně a v termínu.

V úvodu práce je poutavě a přehledně popsána patofyziologie a prenatální diagnostika předčasných porodů. V navazující části je kapitola popisující separační techniky a hmotnostní spektrometrii. Zde se objevuje mnoho nepřesností, zbytečné zacházení do detailů popisu jednotlivých částí hmotnostního spektrometru a proteomických přístupů, které se nekryjí s metodami používanými v experimentální části. Studentka využívá odkazy na zastaralou literaturu a popisuje již překonané instrumentace, nezmiňuje novinky ze současné doby. Příkladem je Tabulka 1 uvádějící parametry hmotnostních analyzátorů s odkazem na článek z roku 2012. Zkratka MS je používána k různým vyjádřením: nesprávně jako podstatné jméno, pro označení hmotnostního spektrometru (viz přednáška prof. Holčapka dostupná na webu: https://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf), nebo jako přídavné jméno, hmotnostní spektrometrie (např. str. 47, nadpis „…proteomická MS analýza plodové vody"). Jedna z nejhůře napsaných částí se týká popisu metody SILAC (str. 41). Co znamená „*lehce, těžce značené buňky a kontrola bez značení*"? Jak se liší „*lehce značené buňky*" od „*kontrol bez značení*"? Jak lze „*ihned po kultivaci smíchat dohromady*? Není uvedeno, co se má smíchat a

není ani zmíněno, že se jedná o metodu relativní kvantifikace, tedy vzorky by se měly míchat v přesně vymezeném poměru založeném na změřené koncentraci proteinů nebo počtu kultivovaných buněk nebo jiném kvantifikačním postupu daných vzorků. Není uvedeno, proč a v jakých typech experimentů se tento postup používá a chybí literární odkaz na zmiňovanou konverzi argininu na prolin. Další problematická část se týká popisu fragmentačních spekter (str. 35). Např. co je myšleno v poslední větě na této straně „*...obsah analytu ve zkoumaném vzorku...*"? Jsou to proteiny, peptidy nebo aminokyseliny? Pravděpodobně se jedná o zjištění aminokyselinové sekvence peptidu v souvislosti se zmiňovanými fragmentačními technikami? Takových nepřesných a neodborných vyjádření je v dizertační práci mnoho, jejich vypisování by zabralo další stranu posudku. To považuji u končící PGS studentky za velký problém.

V poslední kapitole teoretického úvodu jsou popisovány biomarkery předčasného porodu a proteomická analýza plodové vody, kterou považuji za dobře napsanou.

V teoretickém úvodu však zcela chybí kapitola popisující hodnocení hmotnostně spektrometrických dat a nástroje pro statistickou analýzu. V dnešní době to je ta nejdůležitější část zpracování a prezentace výsledků. Sama studentka uvádí, že se podílela hlavně na hodnocení dat. Proč tedy místo detailních popisů separačních technik a částí hmotnostních spektrometrů se raději nevěnovala právě této části, ve které má více zkušeností a je jí věnována velká část popisované experimentální práce? Dále mi chybí uvedení cílů dizertační práce a popis jejich splnění či nesplnění.

Experimentální část podrobně popisuje průběh a hodnocení proteomických analýz plodových vod. Název kapitoly 4.3 „ *Statistické zpracování dat, jejich identifikace a kvantifikace*" (str. 77) nedává smysl a měl by být změněn. Nejprve se identifikují a kvantifikují proteiny/peptidy a až potom se statisticky hodnotí. Na stejné straně 77 chybí citace na uvedené programy (např. MaxQuant, Perseus, program R). Ve výsledkové části je kromě jiného podrobně popsáno hodnocení dat. Jejich interpretace včetně validace vybraných dysregulovaných proteinů, která byla provedena na spolupracujícím švédském pracovišti je pak shrnuta v Diskuzi, jenž považuji za zdařile napsanou kapitolu. V přílohách jsou mimo jiné nesprávně nazvané záznamy *full scanu MS* multiplexu 8 a12 (Příloha 2), ve skutečnosti se však jedná o celkový iontový proud (TIC záznamy).

Dotazy k obhajobě dizertační práce

1) Mohla byste vysvětlit **rozdíl mezi CID a HCD fragmentací**? Co je to **dynamická exkluze**?

2) **Existuje referenční genomová/proteinová databáze lidské plodové vody?** Možná právě v ní by se mohly nacházet specifické mutace či jiné změny na proteinové úrovni, které nejsou obsaženy v referenční lidské proteinové databázi (např. SwissProt) a které proto nejsou dohledatelné z hmotnostně spektrometrických dat. Předpokládá se **personalizovaná léčba pacientek**? Jak bylo v úvodu dizertační práce zmíněno, předčasný porod je multifaktoriální syndrom a jeho patofyziologie není dosud známa. Tedy u každé ženy může být jiný důvod předčasného porodu. Lze to tedy zjednodušit na jeden zánětlivý patologický proces? Co když zánět u dané pacientky s předčasným porodem vůbec nebyl?

3) V tabulce 27 (str. 90) je mezi statisticky významnými proteiny uveden **Keratin** (P35908). Nemůže se jednat o **kontaminaci**? Na obrázku 24 (str. 91-92) není vidět rozdíl mezi relativními hladinami proteinů P24593, P49913 a P35908. Mohla byste to okomentovat?

4) Bylo by možné studovat **rozdíly proteinů depletovaných z plodové vody** (albumin, IgG a dalších), např. na úrovni změn v posttranslačních modifikacích nebo změnách v jejich struktuře?

Závěr

Mgr. Petra Zedníková prokázala tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu. Přestože se v teoretické části dizertační práce vyskytuje mnoho nepřesností, nesnižuje to samotnou vysokou úroveň experimentální práce. Potvrzují to výsledky publikované ve vědeckých časopisech s IF, u nichž proběhlo recenzní řízení. Proto **doporučuji předloženou dizertační práci k obhajobě**. Na základě úspěšné obhajoby pak navrhuji udělení akademického titulu Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Brně 30.10. 2020

prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.