

Oponentský posudok na diplomovú prácu

Meno posudzovateľa: Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.

Autor: Bc. Zuzana Gajdárová

Názov práce: Mikrobiota a idiopatické črevné zápaly

Ciele práce:

Autorka v diplomovej práci sledovala reaktivitu buniek periférnej krvi pacientov s IBD na vybrané mikrobiálne stimuly. Konkrétne ciele boli: 1) izolácia PBMC z krvi pacientov a zber materiálu, 2) analýza reaktivity PBMC pacientov na vybrané mikrobiálne stimuly *in vitro* pomocou prietokovej cytometrie, 3) testovanie potenciálne nových biomarkerov za použitia séra pacientov pomocou ELISA metódy.

Štruktúra (členenie práce): Členenie práce je štandardné. Rozsah práce: 54 strán vlastného textu.

Literárny prehľad:

Literárny prehľad zodpovedá téme práce, ale autorka sa mohla venovať niektorým častiam podrobnejšie a zísť do väčších detailov. Napr. na str. 12 je uvedené: „Jeden z významných regulátorov imunity v čreve je aj molekula NOD2. Expresia molekuly NOD2 v črevnej sliznici je ovplyvnená prítomnosťou mikrobioty a expresia NOD2 ovplyvňuje mikrobiotu. Hostiteľ cez NOD2 a komenzálne baktérie udržiava homeostázu cez vzájomnú reguláciu (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2009).“ Dané tvrdenie je veľmi všeobecné, nezahŕňa vysvetlenie mechanizmu. Podrobnejšie by mohlo byť rozpísané aj zapojenie jednotlivých buniek imunitného systému v daných ochoreniach, a to hlavne tých populácií, ktorých zastúpenie bolo v práci detegované.

Aj keď je celkovo literárny prehľad napísaný zrozumiteľne, jeho kvalita je znížená nižšou úrovňou práce po formálnej stránke.

Autorka v práci použila 233 literárnych zdrojov a 2 internetové zdroje (z toho je 86 prác od roku 2014). Daný počet výrazne presahuje bežný počet citácií pre diplomovú prácu. Viac ako štvrtinu z daného počtu tvoria súhrnné články a autorka ich cituje v mnohých prípadoch, aj keď je dohľadateľná primárna literatúra, ktorá je uvedená priamo v danom review.

V niektorých prípadoch chýbajú citácie, a to napr. v kapitole 5. Výsledky pri popise zapojenia jednotlivých cytokínov v imunitných odpovediach. Taktiež napr. nie sú uvedené dôležité citácie k nasledovným vetám: „V predchádzajúcej štúdii boli na základe multiarray identifikované nové potenciálne biomarkery.“ (str. 30) a „Zvolené baktérie predstavujú typických zástupcov mikrobioty českej populácie.“ (str. 32).

Zoznam použitej literatúry obsahuje veľa chýb, resp. je nejednotný. Dokonca vo viacerých prípadoch nesedia ani roky, v ktorých boli štúdie prevedené, iný rok je uvedený v literárnom prehľade a iný v zozname literatúry. Citácia Bajer *et al.* je uvedená v zozname literatúry dvakrát. V texte autorka citujete dve rôzne práce od toho istého autora, ktoré boli uverejnené

v tom istom roku (dvakrát práca od Den Besten *et al.* 2013 a dvakrát práca od Lin *et al.* 2015), ale keďže sa jedná o dve rozdielne práce, je nutné ich od seba odlíšiť. Citácie pri obrázkoch 1 a 2 nie sú uvedené v zozname literatúry.

Materiál a metódy:

Metódy zodpovedajú experimentálnej časti a väčšinou sú zrozumiteľne napísané.

Uvediem ale pár pripomienok. Chýba súhrnný výpis materiálu a prístrojov, nie je uvedené, aké antibiotiká boli použité pri kultivácii buniek. Pri zmienke o Inštitúte klinickej a experimentálnej medicíny je nutné uviesť mesto a štát. Pri popise dot plotov nie je nutné uvádzať fluorescenčné značenie danej protilátky, ale znak, o ktorý sa jedná.

Popis postupu pri zamrazovaní buniek v podkapitole 4.1.2 Zamrazenie PBMC nie je veľmi prehľadný. Týka sa to hlavne použitia dvoch rôznych médií (M1 a M2). Všeobecne v metódach je nutné písať finálnu koncentráciu, či už určitého roztoku alebo počtu buniek v danom objeme.

Taktiež podkapitola 4.3.1 Optimalizácia protokolu nie je náležite opísaná. Hlavné nedostatky sú v popise obrázkov (obr. 6 a obr. 7), kde nie je zrejmé, čo znamenajú skratky CTL, aké je to médium, resp. čo znamená R-BLAU a R-BACT? Na obr. 6 je nesprávne označená oblasť pre nekrózu.

Platí podobná pripomienka, ktorú som zmienila k literárnemu prehľadu, samotný text trpí na nedostatky po formálnej stránke a na používanie neodborných alebo hovorových slov. Napr. doska, riediace korýtko nepatria do odbornej terminológie pre prietokovú cytometriu, rovnako ako slovné spojenia: „vyhodiť supernatant“, „oklepať dosku“ a pod.

Experimentálna časť:

Autorka v experimentálnej časti väčšinou prehľadne popisuje získané výsledky, ale podľa môjho názoru niektoré tvrdenia by boli vhodnejšie do diskusie.

Aj keď v úvode kapitoly 4. Materiál a metodika je uvedený počet pacientov resp. zdravých darcov, bolo by vhodné uviesť daný počet pri popise každého výsledku, či daný experiment bol prevedený na rovnakom súbore pacientov/zdravých darcov?

Ďalšie nedostatky budú zhrnuté v pripomienkach a otázkach.

Diskusie:

Diskusie má 4 strany, podľa môjho názoru by mala byť obsiahlejšia. Výsledky sú porovnávané s inými štúdiami, aj keď nie vždy dostatočne. Napr. nestačí tvrdiť, že výsledok, ktorý vyšiel v rozpore s literatúrou je zaujímavý (viď zvýšenie produkcie TNF- α po inkubácii s *Lactobacillom*, str. 58), ale je potrebné uviesť možné vysvetlenie protichodných výsledkov.

Závery (Súhrn):

Závery sú prehľadné a korešpondujú s cieľmi práce, ale mám výhradu k uvádzaniu výsledkov, ktoré sú nesignifikantné.

Súčasťou záveru je aj odkaz na publikáciu Coufal, *et al.* 2019, kde je Zuzana Gajdárová uvedená ako spoluautor článku.

Formálna úroveň práce (obrazová dokumentácia, grafika, text, jazyková úroveň):

Ako už bolo spomenuté, formálna úroveň práce nie je na veľmi dobrej úrovni. V práci sa vyskytuje väčšie množstvo chýb (vrátane nesprávneho použitia i/y), preklepov, niektoré časti textu sú štylisticky nesprávne.

Niektoré z ďalších pripomienok budú uvedené nižšie.

Pripomienky:

- 1) Číslovanie strán má začínať kapitolou 1. Úvod, nezačína sa s číslovaním hneď od titulnej strany.
- 2) Pri generovaní obsahu zrejme došlo k chybe, pretože od podkapitoly 3.1 Idiopatické črevné zápal je nesprávne číslovanie podkapitol v literárnom prehľade (namiesto podkapitol s označením 3.1, 3.2, 4.1 správne by malo byť 2.3, 2.4 a 2.5). Výsledkom sú napr. 2 rôzne podkapitoly s rovnakým číslovaním 4.1 (Biomarkery a Vzorky krvi).
- 3) Skratky, ktoré sú prvýkrát uvedené v texte, nie sú vždy vysvetlené. Rovnako nie sú vždy vysvetlené skratky v popisoch obrázkov.
- 4) Na str. 12 uvádzate: „GALT sa dá rozdeliť na 2 funkčné časti: indukčnú a efektorovú.“ Podľa práce, ktorú citujete (Ohno, 2015), dané delenie je platné pre imunitný systém čreva a GALT patrí pod jeho indukčnú časť. Bolo citované review, aj keď pri danej informácii boli uvedené primárne zdroje.
- 5) Na str. 17 píšete: „S CD sa spája aj subpopulácia CD4⁺ γδ T-lymfocytov. Hovorí sa o ich protektívnom účinku prostredníctvom regulovania opravy tkaniva a kontroly infiltrácie neutrofilov cez typ Vδ1⁺ buniek, ktoré sú u CD pacientov v menšom množstve (Kadivar *et al.*, 2016).“ Správne má byť uvedená populácia CD8αβ⁺ γδ T lymfocytov.
- 6) V podkapitole 3.1.4 Diagnostika a liečba (str. 20) je ako jeden z liekov uvedený budesonide 9, ale predpokladám, že číslovka „9“ je chybné uvedené, pretože v článku, ktorý citujete, sa uvádza iba v rámci dávkovania (9 mg/deň). Podobne predpokladám, že je to aj pri azathioprine 2. Na str. 25 používate termín G myši, predpokladám, že ste mali na mysli GF (germ-free) myši.
- 7) Na str. 21 uvádzate: „Naša mikrobiota je zložená z viac ako trilióna bakteriálnych buniek, čo je približne rovnako ako všetky bunky v ľudskom tele (Sender *et al.*, 2016).“ Správne je 10¹³, trilión je 10¹⁸.
- 8) Obr. 6 má slabšiu kvalitu. Text na niekoľkých stranách (8, 9, 33, 42, 46-51, 53, 55, 57) prechádza cez pravý okraj. Po grafickej stránke rovnako nie je vhodné, ak text na niektorých stranách (33, 45-49) je veľmi blízko spodnej čiary, ktorá tvorí okraj.

- 9) Nie je vhodné stanoviť si za jeden z cieľov izoláciu PBMC a zber materiálu.
- 10) V podkapitole 4.1 Vzorky krvi (str. 33) uvádzate rozdelenie jednotlivých pacientov a zdravých darcov a ich percentuálne zastúpenie. Bolo by vhodnejšie uvádzať hodnoty v reálnych číslach a nie v percentách, a navyše po prerátaní vychádzajú desatinné čísla.
- 11) Väčšinou nie je uvedený odkaz na obrázok a tabuľku v texte. Popis tabuliek má byť nad a nie pod tabuľkou. Obrázok na str. 33 nie je vôbec označený. Nie je vhodné prestať s klasickým označením obr. č. a zmeniť to na graf č. (v kapitole 5. Výsledky), je to potom neprehľadné. Grafy 6 a 7 (str. 50 a 51) nemajú uvedený názov priamo v grafe, o aký cytokín sa jedná, namiesto toho je na všetkých grafoch uvedené Relaps vs Remisia, resp. Pankolitida vs parciálna forma, a navyše majú oba grafy rovnakú legendu aj s rovnakým názvom. Grafy 8B, 9D (str. 53 a 54) nemajú uvedený popis y-ovej osi a grafy 9 a 10 nie sú na jednej strane, zhoršuje to prehľadnosť.

Otázky:

- 1) V podkapitole 4.3.1 Optimalizácia protokolu uvádzate grafy 6 a 7, ktoré nemajú smerodajné odchýlky. Bola daná optimalizácia pokusov robená iba raz?
- 2) Na str. 42 uvádzate gatovaciu stratégiu, ale podľa zoznamu použitých protilátok (Tab. 2) nie je úplná. Hodnotili ste aj iné populácie, napr. CD154⁺ lymfocyty? Nemôžu zohrávať dôležitú úlohu v daných ochoreniach aj bunky, ktoré produkujú viacero cytokínov, zamerali ste sa na takéto bunky? Ak áno, ukážte, prosím, gatovaciu stratégiu aj pre dané populácie buniek.
- 3) Ukážte reprezentatívne dot ploty k výsledkom v podkapitolách 5.1.1-5.1.5. Spodná hranica pre IL2⁺/CD3⁺CD4⁺ lymfocyty je okolo 0,02 %, čo je veľmi nízka hodnota. Aký je absolútny počet buniek v daných populáciách? V metódach je uvedené použitie stafylokokového enterotoxínu B ako pozitívnej kontroly, ale dané výsledky nie sú v práci zahrnuté, môžete ich taktiež ukázať (vo forme dot plotov)? Taktiež ukážte dot ploty pre negatívnu kontrolu a FMO kontroly. Dané výsledky sú vzťahnuté k nestimulovanej kontrole, ale ako by vyznelo porovnanie zdravých kontrol k jednotlivým typom ochorenia s príslušným stimulom? Napr. pri produkcii IL2 uvádzate zvýšenú produkciu po inkubácii s *Faecalibacterium*, ale rovnako výrazne na ňu odpovedali aj zdraví darcovia.
- 4) Vysvetlite, prosím, rozdelenie pacientov v podkapitolách 5.1.6 Porovnanie obdobia relapsu a remisie a 5.1.7 Porovnanie rozdielnych foriem ochorenia. Porovnajte dané rozdelenie s tým, ktoré je uvedené na str. 33, z popisu výsledkov to nebolo jasné. V daných grafoch (graf č. 6 a 7) nie sú uvedené hodnoty pre zdravých darcov, môžete ich uviesť?
- 5) Na str. 27 je uvedené: „Systém matrix metaloproteináz je známy svojou zvýšenou produkciou u IBD pacientov.“ V práci prezentujete zníženú hladinu MMP-9 pre všetky ochorenia v porovnaní so zdravými darcami. Ako si vysvetľujete daný rozdiel? Na str. 28-29 tvrdíte: I-FABP je primárne exprimovaný v čreve a v sére zdravých jedincov je nedetekovateľný (Pelsers, 2003).“ Na grafe 8E sú ukázané hodnoty pre daný proteín u zdravých darcov. V čom spočíva rozdiel?

Splnenie cieľov práce a celkové hodnotenie:

Zuzana Gajdárová predložila k obhajobe celkovo dobrú diplomovú prácu s aktuálnou a zaujímavou témou, ale s mnohými nedostatkami. Chyby v gramatike a štylistike textu zhoršili kvalitu práce a odrazili sa aj v celkovom hodnotení.

Prácu odporúčam na obhajobu s celkovým hodnotením na rozhraní veľmi dobre/dobre.

Dátum: 3.9.2019

Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.