

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

*Jméno posuzovatele:*

RNDr. Karel Drbal, Ph.D

*Datum:*

9. 9. 2016

*Autor:*

Bc. Dagmar Damašková

*Název práce:*

Změny střevního mikrobiomu u pacientů s idiosyncratickými střevními záněty léčenými pomocí anti-TNF- $\alpha$

***Cíle práce***

Cíle nebyly zadané v Průběžné náplni práce v SIS.

V práci byly následně zmíněny tyto účely studie:

- srovnání tří extrakčních technik DNA
- vliv adjuvantní léčby na složení mikrobioty
- vliv biologické léčby na složení mikrobioty

Centrální hypotéza (str. 11), že se liší složení mikrobioty mezi pacienty s ulcerativní kolitidou (UC) a Crohnovou chorobou (CD), není ani zdůvodněná, ani není doložená současnými poznatky, ale nakonec není ani dostatečně diskutovaná s prezentovanými daty.

***Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?*** ANO

*Rozsah práce (počet stran):*

56 stran, 84 referencí, 6 stran doplňkových dat

*Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova?*

ANO

*Je uveden seznam zkratk?*

ANO, ale některé jsou nadbytečné (názvy

organismů, genů, komerčních kitů)

***Literární přehled:***

*Odpovídá tématu?*

ANO, částečně – viz níže.

*Je napsán srozumitelně?*

NE, obsahuje neurčitá sdělení v nadměrném počtu, ale hlavně není úvodem pro kvalitní diskuzi vlastních výsledků. Sama základní hypotéza není podložena konkurenčními výzkumy, ani logicky zdůvodněná v Literárním přehledu. Tato kapitola je neuspořádaná v kontextu role imunitního systému, respektive mikrobiomu u IBD pacientů. Autorka pracuje s obecnými sděleními více než s relevantními fakty. V oblasti mikrobiologie je úroveň lepší, ale to není můj obor. Proto mohlo v některých pasážích mého posudku dojít k neporozumění.

*Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů?*

NE, v klíčové pasáži o střevním mikrobiomu (str. 13) autorka sice správně cituje zásadní práce z přelomu let 2010-2012, ale dále již její snaha dohledat významné práce není patrná. **Práce z posledních pěti let tvoří velice nízkou část – pouze 25 z celkových 84 citací, a pouze 8 z posledních tří let!** Opravdu nepřibyly za poslední roky nové studie? Připomínám, že právě kolem roku 2010 se teprve začaly objevovat první práce o střevním mikrobiomu.

Kapitola „Mucosal Immunity“ je sice vložena do Literárního přehledu, ale nakonec není žádný výsledek diskutovaný s ohledem na imunitní parametry.

**V Závěru potom není ani jednou zmíněný imunologicky relevantní výsledek a chybí také mnoho imunologicky relevantních studií z posledních let.**

Namátkou uvádím review i primární články: Jostins, L. et al. *Nature* **491**: 119 (2012), Ellinghaus, D. et al. *Nat. Genet.* **48**: 510 (2016), Goodrich, J.K. et al. *Cell Host Microbe* **19**: 731 (2016), Krausgruber, T. et al. *Nat Commun* **7**: 11627 (2016).

*Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány?*

**NE, logická konstrukce hypotézy založené na současných publikovaných datech v práci chybí. Zásadní otázka - jaká je stabilita mikrobiomu v daných místech lidského těla - byla založená na jediné citaci z roku 2011: Caporaso, J.G. et al. *Genome Biol.* **12**: R50 (2011), která tvrdí, že je velice proměnný, a která byla citovaná 371x. Novější práce, které toto rozporují, již nebyly citované.**

Jsem přesvědčený, že tomu tak není, ale je-li tomu skutečně tak, jak potom může autorka usuzovat na příčinnou vazbu takto proměnného mikrobiomu k danému onemocnění? Respektive jaká měření by autorka musela provést, aby časový faktor variability mohla statisticky eliminovat? Kolik pacientů? Jak dlouhé sledování je nutné? Tyto otázky si autorka neklade. Pro zjištění kauzality je případná nestabilita mikrobiomu velkým problémem.

Chybí podrobný úvod do střevního mikrobiomu a porovnání výsledků stolice se situací ve střevě. Například není jasné, zda toto jsou 3 hlavní bakteriální fylogenetické skupiny: *Bacteriodes*, *Prevotella* a *Ruminococcus*. Následně je ovšem v Tabulce 7 (str. 43.) zařazen druh *Prevotella copri* mezi Bacteroidetes; Bacteroidia. Je to stejná skupina jako *Bacteriodes*?

**Chybí citace k důležitým sdělením a hypotézám, ze kterých práce vychází, včetně projektů MetaHIT a Human Microbiome Project. Klíčový stav dysbiózy – jak ji autorka popisuje vzhledem k IBD – není vůbec podpořen citacemi v kapitolách 2.2, 2.3 a 2.4.1. Autorka cituje pouze jediné krátké review z roku 2004, navíc více polemizující než vysvětlující příčinu!**

Některé citace jsou chybně citované, například:

Monast, C, S Telesco, K Li, K Hayden, and C Brodmerkel. 2016. "The Role of the Microbiome in Clinical Response to Golimumab in Ulcerative Colitis." In 11th Congress of ECCO, Amsterdam 2016, 1.

Kverka, Miloslav, and Helena Tlaskalová-Hogenová. n.d. "Intestinal Microbiota: Facts and Fiction." *Digestive Diseases*.

Inglis, Gd, Mc Thomas, Dk Thomas, Ml Kalmokoff, Spj Brooks, and Lb Selinger. 2012. "Molecular Methods to Measure Intestinal Bacteria: A Review." *Journal of AOAC* ... **95** (1): 5–24. doi:10.5740/jaoacint.SGE.

Darfeuille–Michaud, A, C Neut, N Barnich, E Lederman, P Di Martino, P Desreumaux, L Gambiez, B Joly, A Cortot, and J.-F. Colombel. 1998. "Presence of Adherent Escherichia Coli Strains in Ileal Mucosa of Patients with Crohn's Disease." *Gastroenterology* **115** (February 2016): 1405–13. doi:S0016508598006027 [pii].

Arumugam, Manimozhiyan, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Jean-michel Batto, Marcelo Bertalan, Natalia Borrue, and Francesc Casellas. 2011. "Enterotypes of the Human Gut Microbiome." *Nature* **473** (7346): 174–80. doi:10.1038/nature09944. Enterotypes.

**Citace: „Neuman in his PhD thesis...” není citovaná vůbec, a to přitom diskutuje klíčovou otázku.**

Autorka si příště musí všechny citace jednu po druhé zkontrolovat. Je to jeden z důležitých požadavků na diplomovou práci. Doporučuji provázat citace v textu s referencemi na konci textu a následně i doi: odkaz ponechat ve formě odkazu. Je to pro oponenta mnohem příjemnější a usnadňuje mu to práci.

### ***Materiál a metody:***

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO, ale některé, hlavně metody a postupy pro analýzu jsou v kapitole nepopsané – viz Otázky oponenta.

Kolik metod bylo použito? 3 metodiky přípravy vzorku a 3 metodiky jeho analýzy – PCR, DGGE, NGS, více statistických metod bez popisu

Jsou metody srozumitelně popsány? Z 50% - není uveden detail u souboru pacientů, ani doba odběru vzorků u adjuvantní léčby. Někde chybí zdroje reagensií (chemikálie). Analýza dat je částečně popsána velice detailně (pro QIIME analýzu NGS dat na str. 28-29), ale jiné metodiky vůbec (H index, NCBI blast, PCoA, ANOVA, Wilks' lambda). **Pro všechny použité metodiky není kreditovaná jiná osoba, proto předpokládám, že všechny experimenty a datové analýzy prováděla autorka sama.**

### ***Experimentální část:***

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO, v metodické úrovni ano, ve vědecké hůře.

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, všechna zobrazená data jsou popsána kvalitně – až na PCoA analýzu (Obr. 14).

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

**50% – provedení ANO** – není zdůvodněné, proč nebyla udělaná analýza mikrobioty u všech vzorků - hlavně proč byla NGS udělaná pouze u biologické léčby, ale **analýza dat NE** – byla pouze okrajově vztažena ke klinickým datům, které autorka v průběhu práce několikrát zmiňuje (zařazení pacienti jsou shrnutí bez komentáře v Supplementary Figure 1).

### ***Diskuze:***

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO, 30% - není podaná odpověď na hypotézy, které jsou v práci uvedené. Výsledky jsou pouze fragmentární.

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? 50%, ovšem starší

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky NE, autorka nakonec zpochybňuje správnost metodologie a návrhu studie v kap. 5.4.

### ***Závěry (Souhrn) :***

Jsou výstižné?

NE, během čtení práce jsem se nedozvěděl zásadní sdělení, jak proměnlivý je střevní mikrobiom, detegovaný ve stolici pacientů ve zdraví a nemoci. Naměřené a vypočítané hodnoty často nekorespondují s jejich interpretací (viz H index). Autorka shrnuje v Závěru i vliv klinického stavu pacientů, který nebyl v práci statisticky vyhodnocený, ale opakovaně udává, že se jedná o nevýznamný důkaz: „*Bacteroidetes* as well as *Firmicutes* were found to increase during the course of therapy which, in case of *Bacteroidetes*, **corresponded to the disease activity of the patient** (from severe to moderate). However, this is just **anecdotal evidence** and more research needs to be done in order to draw some general conclusions.“ Zároveň volá po standardizaci, aniž by v textu zmínila některé snahy. To není vhodné.

**Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):**

Angličtina místy velmi nesrozumitelná, až hovorového stylu. Některá slova zde používaná neexistují nebo mají jiný význam. **Proč si autorka zvolila angličtinu ke své diplomové práci?**

Časté překlepy čtení ještě více ztěžují. **Práce nemohla projít ani automatickou kontrolou pravopisu.** Neurčitost sdělení, způsobené častým používáním slov i v klíčových pasážích, kdy by měly zaznít konkrétní údaje: „could“, „might“, vede k tvoření vágních vět, které zpochybňují co bylo řečeno předtím. Vyskytují se přímo rozporná tvrzení.

Práce je protkaná mnoha nepřesnostmi, chybějícími členy, často chybně používaným plurálem, anglicky znějícími českými výrazy a hovorovými idiomy. Tak hned v poděkování se ve větě kreditující za anglickou korekci objevují dvě chyby: „lastly“ a „psychical“ jsou špatně. První je adjektivem ve tvaru „last“ a druhé se pouze vzácně používá v souvislosti s nějakou nedostatečností, například zdravotní. Lépe je použít „emotional“ nebo raději vůbec žádná adjektiva. **Anglické termíny v českém textu musí být ohraničené uvozovkami.**

V poděkování se mísí i různé familiární výrazy. Nikdo například neví, kdo je Helena a pro anglicky mluvícího oponenta není jasné, že Kuba je Jakub.

Už i v titulku práce jsou nepřesnosti a překlad není úplný. Doporučuji používat označení protilátek bez předpony anti-. TNF-alfa je starý název, je vhodnější používat genový název TNF – viz též citované review z roku 2005: Ware, Carl F. 2005. “NETWORK COMMUNICATIONS: Lymphotoxins, LIGHT, and TNF.” *Annual Review of Immunology* 23 (1): 787–819.

**Názvy genů se píší kurzívou.**

Chybí datum a podpis na druhé straně. Jak je tomu v tištěné verzi?

**Opakuje se celý první odstavec v Abstraktu a Úvodu.**

***Splnění cílů práce a celkové hodnocení:***

Práce je popisným sdělením s metodickou podotázkou o vhodném způsobu extrakce DNA z komplexních vzorků střevního mikrobiomu u nemocných se zánětlivými střevními chorobami (IBD) - ulcerativní kolitidou (UC) a Crohnovou chorobou (CD).

Předložená práce je více metodická – autorka srovnává a kvantifikuje izolaci DNA, ukazuje, že MM metoda izolace DNA dává nejvyšší diverzitu, ale přitom má nejnižší výtěžky, aby následně použila jinou metodu s nižším pokrytím a na konci práce sdělila, že právě pokrytí celého mikrobiomu je kritickým parametrem. Následně porovnává i dvě sekvenační metodiky diagnostiky bakterií.

Celá práce trpí nedostatky provázání literárního úvodu, analýzy vlastních dat, respektive detailním nezačleněním klinických dat a rozsáhlé diskuze o vztahu stability mikrobiomu, detekce konkrétních patologicky relevantních kmenů a roli imunitního systému u IBD – to má být hlavní náplň a znalost, kterou se student magisterského studia má naučit. Během čtení jsem se v textu ztrácel a byl jsem nucen dohledávat relevantní informace. Autorka bohužel svoje závěry nediskutuje vzhledem k vlastnímu tématu práce, který je kompatibilní se studiem Imunologie, a kterým je klinický stav IBD pacientů, resp. jeho imunologickému kontextu po inhibici TNF. To je škoda, dodalo by to práci na váze.

**Za hlavní nedostatek této práce považuji právě absenci logické souvislosti vztahu mezi TNF a střevním mikrobiomem a vliv TNF ve střevě a séru na stav pacientů s IBD.**

Přirozená produkce TNF různými imunitními buňkami není zvažovaná, zmíněné jsou pouze makrofágy. Toto téma není v celé práci vysvětlené a navíc k němu nejsou citované všechny dostupné zdroje s uvedením, že to zkoumala pouze jediná práce. Není to pravda.

Pouští-li autorka do detailních informací, například v otázce genetické predispozice u IBD, opět cituje staré práce, a ne ty nové, kterých je mnoho: Sadaghian Sadabad, M. et al. *Gut* **64**: 1546 (2015), Chu, H. et al. *Science* **352**: 1116 (2016).

Analytická práce nezahrnuje žádná imunologicky relevantní data a soustředí se pouze na skladbu mikrobioty ve stolici pacientů s IBD, ale statistické srovnání se zdravými dárci chybí úplně. Diskuse se současnými publikacemi také chybí i v kritických bodech pracovní hypotézy:

- je střevní mikrobiom stálý
- jak se liší mikrobiom ve stolici a ve střevě
- jak se liší zdraví a nemocní (IBD)

Můj dominantní pohled je, že novější citace k důležitým otázkám autorka nedohledává a často se spokojí pouze s jedinou citací k určité otázce, navíc staršího data. Příkladem je centrální otázka role dysbiózy v IBD: Rajca, S. et al. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**: 978 (2014). Namátkou, zde jsou další citace: Hedin, C. et al. *Gut* **65**: 944 (2016), Schauback, M. et al. *Gut* **65**: 225 (2016), Lewis, J.D. et al. *Cell Host Microbe* **18**: 489 (2015).

Při analýze mikrobiomu se autorka často spoléhá na jejich náhodné a vizuální hodnocení, přitom data lze zpracovat sofistikovanějším způsobem. Individuální rozdíly u pacientů pak komentuje bez návaznosti na jejich klinický stav.

Není jasné jakou logikou autorka vybírala jednotlivé proužky DGGE gelů pro Sangerovo sekvenování, ani kolik sekvenací bylo celkem provedeno. Výběr (Obr. 2) následně nekoresponduje se sekvenačními daty – byla zdokumentovaná pouze polovina označených vzorků (Tab.4). Vzorek č. 1 neměl žádnou podobnost – popsán jako „overlapping sequences“. Není mi jasné, co to znamená a proč nebylo možné osekvenovat více klonů. Proč autorka neosekvenovala více rozdílových oblastí DGGE gelů, hlavně u vzorků z pacientů na biologické léčbě? Tyto výsledky již dále nejsou dotaženy do konce a jsou vágně komentované: „Therefore, one should take note of the DNA extraction technique used when comparing results from different studies, as there might be some discrepancies. To specify which groups of bacteria are prevalent using a particular DNA extraction method, deeper investigation must be undertaken.“ (str. 33)! Hned v další kapitole zazní: „From Figure 4 and Figure 5 one can see the bacteria profiles of the patients on adjuvant therapy look almost the same“ (str. 36) a závěrem: „Across all patients, the presence or absence of several Bacteroidetes and Firmicutes was documented.“ (str. 39)! Konec. Hned u další kapitoly autorka sděluje, že: „In Figure 7 and Figure 8, one can see how the bacteria profiles of the patients on biological therapy changed over the course of the therapy.“ (str. 41), ale přitom se toto sdělení zakládá na menším počtu osekvenovaných rozdílných pozic (N=5 versus N=13 u adjuvantní terapie). Podobných nekonzistentních hodnotících vyjádření je v práci velmi mnoho. Jiným vyjádřením nelze vůbec rozumět: „The minimal counts per sample were and it was chosen as analysis depth.“

Závěrem práce je, že střevní mikrobiom u každého pacienta je unikátní a že se různě v čase mění. To je podle mého názoru příliš vágní informace, statisticky nedoložená. Chybí vysvětlení H indexu, který autorka považuje u adjuvantní léčby za nesignifikantní (hodnota  $t = 2.31$ ;  $p = 0.07$ ), zatímco u biologické léčby je signifikantní (hodnota  $t = 1.89$ ;  $p = 0.07$ ). Proč nebyl H index vypočítán i pro NGS data, která jsou mnohem robustnější než PCR-DGGE? Na konci diskuzní části autorka zpochybní téměř vše, co předtím popsala (kap. 5.4). **Tyto pochybnosti jsou skutečně relevantní a autorka je popisuje v detailu, nicméně takový kritický náhled měli spolu se školitelem provést ještě před návrhem vlastní studie a ne na jejím konci.**

Přes všechny výše zmíněné výhrady doporučuji práci Dagmar Damaškové k obhájení.

### **Otázky a připomínky oponenta:**

**Otázky lze rozdělit na dvě oblasti: technickou a imunologickou. Autorka necht' zodpoví tučně vyznačené a vybere si po jedné další otázce z každé oblasti, celkem šest.**

#### Technické otázky:

1/ Kvituji detailní popis metodiky pro analýzu NGS dat na str. 28-29. Zde není kreditovaná jiná osoba, proto předpokládám, že je to dílo autorky. V jakém skriptovacím jazyce pracuje QIIME? Můžete napsat skript, který by Vám z NGS dat (složený soubor všech sekvencí) seřadil kmeny (včetně těch vzácných) dle jejich distribuce, a to v závislosti na aktivitě onemocnění a klinické odpovědi pacientů, případě typu onemocnění a lokalizaci onemocnění. Data nám ukažte a popište trendy.

**2/ Jaká je celková diverzita bakterií ve střevě? Jestliže Vám univerzální 16S rDNA primery neamplifikují všechny kmeny bakterií v lidském střevě, jak tvrdíte v diskuzi: „bacterial primers do not have 100% coverage which means some taxa might be left out.“, kolik procent kmenů tedy pokrývá? Je 16S rRNA opravdu tak konzervovaná? Uveďte stupeň homologie v rámci prokaryot, prosím.**

**Jakou jinou techniku byste použila při znalosti komplexity vzorku a přítomnosti látek interferujících s PCR (viz str. 50) a proč?**

**S tím souvisí i stupeň pokrytí NGS sekvencí („coverage“). Jak vysoké toto číslo bylo?**

**Jakou výhodu dnes představuje DGGE rozdělení komplexních vzorků (metoda z počátků devadesátých let minulého století) a následná sekvenace náhodně vybraných vzorků oproti NGS „shotgun“ sekvenování celého vzorku, resp. jeho 16S rDNA sekvencí? Kolik kmenů bakterií v DGGE gelech rutinně identifikujete?**

**Srovnajte finanční a časovou stránku obou použitých sekvenačních metod od přípravy vzorku až po analýzu dat.**

3/ PCR-DGGE metoda dává různé otisky pro různé izolační metodiky. Jak vypadá srovnání technických replikátů, resp. opakované izolace stejného materiálu? Ukažte příklad – myslím tím hlavně reproducibilitu PCR. Co je to „ncbi library“, vůči které byly PCR produkty „blastované“? Co vyplývá z případného nedostatečného pokrytí (viz výše) a nereprodukovatelnosti technických replik?

**4/ Shannonův index diverzity není uveden v metodice, a to považuji za zásadní chybu. Následně není jasné z jakých hodnot autorka vychází – z obrazové analýzy gelů nebo sekvenačních dat? To není v práci jasně popsáno.**

**Vysvětlete jak byl Shannon (H) index vypočítaný – na základě jakých hodnot u kolika pacientů byl zjištěn. Vysvětlete proč si myslíte, že hodnota  $t = 2.31$ ;  $p = 0.07$  u adjuvantní léčby není signifikantní zatímco hodnota  $t = 1.89$ ;  $p = 0.07$  u biologické léčby je signifikantní?**

**Při pohledu na variabilitu mezi pacienty si myslíte, že je tato statistická metoda získaná sdružením všech patientských dat významná? Jak tyto hodnoty korelují s klinickým stavem jednotlivých pacientů?**



Imunologické otázky:

5/ Jak velký problém je neodpovídavost pacientů s IBD na léčbu TNF? Autorka toto zmínila jako fakt v Úvodu bez citace. Nedohledal jsem ji, a proto prosím o jejich uvedení. Liší se u těchto pacientů jejich střevní mikrobiom?

**6/ Mezi IBD pacienty existuje velká heterogenita. Vědecky není zdůvodněné, proč autorka analyzuje celou skupinu IBD pacientů jako jednu kohortu a nerozděluje jí podle typu onemocnění včetně různých lokalizací UC. Není jasně popsán klinický obraz pacientů, jejich rozčlenění do UC a CD skupin, například podle odpovědi na léčbu. Při malém počtu pacientů je tato stratifikace podstatná. Na první pohled je vidět, že pacienti č. 1 a 8 na Obr. 14 klastrují a zároveň mají obdobné klinické parametry. Proč nebyly tyto skupiny oddělené pro vlastní statistickou významnost analýzy mikrobiomu? Koreluje takto ne/přítomnost bakteriálních druhů s konkrétním typem IBD?**

7/ Proveďte souhrnné srovnání Vašich sekvenačních výsledků s kontrolní zdravou skupinou dárců a s klinickým stavem IBD pacientů po biologické a adjuvantní léčbě. Toto vše prosím diskutujte vzhledem ke zmíněným imunitním procesům ve střevě. Připomínám, že v metodice zmiňujete, že zařazovací kritérium pro adjuvantní léčbu bylo, že pacienti **nemají žádné klinické, laboratorní ani endoskopické známky aktivity onemocnění**. Jaké potom můžeme očekávat vstupní rozdíly ve nastavení imunitního systému mezi skupinami s adjuvantní a biologickou léčbou?

**8/ Skutečně může terapie TNF protilátkami působit prostřednictvím agonistického efektu (str. 19)? Na jakých buňkách je příslušná forma transmembránového tmTNF exprimovaný? Jak signalizuje? Jak lze vysvětlit TNF-mediovanou inhibici zánětu prostřednictvím solubilních CD40 a VCAM (str. 19)?**

*Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)*

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

