

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Datum:

29.8.2018

Autor:

Bc. Barbora Těšínská

Název práce:

Komplexní charakterizace subgingiválního plaku - využití moderních sekvenačních metod v diagnostice a sledování léčby onemocnění parodontu

Cíle práce

Při studiu parodontitidy sekvenačními metodami:

- porovnat výsledky získané dvěma sekvenačními metodami
- sledovat časový vývoj mikrobiomu u zdravých osob
- porovnat mikrobiom u třech skupin pacientů – zdravých, s chronickou parodontitidou a agresivní parodontitidou

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE

Rozsah práce (počet stran): 119, z toho 7 stran Seznam použité literatury

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, **ANO NE**

Je uveden seznam zkratek? **ANO NE**

Poznámky ke zkratkám:

Seznam zkratek ne úplný a nepřilíží logický. Jsou uvedeny pouze 4 zkratky, z nichž OM (orální mikrobiom) se používá pouze v anglickém (ale už ne v českém) abstraktu. V práci se běžně používají například zkratky cytokinů (IL-6), ale v seznamu zkratek je jenom **TNF- α** . V seznamu by měly být uvedeny zkratky používané v textu, které se týkají vlastních výsledků, třeba skupin pacientů (H, ChP), které se kombinují s daty odběrů a přítomností parodontálních chobotů, což je v textu vysvětleno hodně zběžně a v seznamu zkratek by to pomohlo. Především pak jde o zkratky z oblasti sekvenací a genomiky (např. OTU, HOT, CT, které by určitě měly být v seznamu (pokud už je tam např. „PCR“).

Literární přehled:

Odpovídá tématu? **ANO NE**

Je napsán srozumitelně? **ANO NE**

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

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

Úvod se zabývá mnoha faktory, které ovlivňují průběh parodontózy, což je cenné při uvažování o výběru pacientů a diskuzi výsledků. Úvod je napsán velmi pěkně, čitelně a srozumitelně.

V práci je použito 132 citací, vzhledem k tématu nechybí ani základní učebnice (Slezák, Škach), což je v pořádku. Neprováděl jsem analýzu podílu citací „z posledních deseti let“, protože by to bylo zavádějící. Jde o téma hodně obtížné, u kterého je v podstatných oblastech (druhy a jejich zařazení do „zdraví nebo nemoci“) málo shrnujících prací. Je podstatné, že jsou dobře využity komplexní práce, které přiřazují bakterie orální mikrobioty zdraví nebo nemoci.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? **ANO** **NE**

Kolik metod bylo použito?

Byly odebírány vzorky bakterií ústní dutiny pacientů, extrahována DNA, úseky 16S rRNA amplifikovány pomocí PCR, izolovány elektroforézou, přečištěny a sekvenovány. Výsledky sekvenace metodou Illumina MiSeq byly statisticky vyhodnoceny, porovnávány s databázemi, vytvořeny OTU a CT.

Jsou metody srozumitelně popsány? **ANO** **NE**

Poznámka: vždy je otázka, pro jaké čtenáře je práce psána. Podle mého soudu je metodika analýzy sekvencí popsána příliš stručně. Je třeba myslet na to, že DP není asi psána pro zkušené genomiky, je to ale věc k úvaze. V naší pracovní skupině například píšeme o principu použitých fluorescenčních metod, pokud se v práci vyskytují. Podrobnější vysvětlení analýzy sekvencí by práci pomohlo (můj názor).

Poznámky:

V metodice jsou v tabulce zmíněny použité programy pro vyhodnocení sekvenačních dat (str. 71). Je tam jen jejich název a odkaz. Podle mě by tam měl být také popis, k čemu jednotlivé programy slouží a kde byly v práci použity.

U odběrů by mohla být uvedena nemocnice nebo klinika, pokud je tam uveden odebírající lékař.

U přístroje „Qubit® 2.0 Fluorometr“ Správně „Fluorometer“ (str. 74)

Některé postupy programu SEED jsou patrně intuitivně, některé by se patřilo vysvětlit - bylo by lépe vysvětlit krok: „*V tomto kroku byly také automaticky odstraněny chiméry*“ (str. 74)

Věta: „*V některých případech nebylo možné na úrovni identity 98,5 % přiřadit jednoznačně právě jeden HOT...*“ je dlouhá a nepřehledná, přestože je velmi podstatná – definuje pojem „CT“
Podstatný statistický test Procrustes není uveden v použitých programech.

Pojmy jako „*matice relativních abundancí*“ (str. 76) by měly být vysvětleny, protože obvyklému čtenáři není příliš jasné, jak jsou reprezentována data pro OTU nebo CT po statistické analýze. Šlo by odkázat na List 8 z Přílohy a odtud vyjít.

Pojem „HEAT MAPA“ je z hlediska češtiny odpudivý. Je to spojení českého a cizího pojmu. Místo něj by bylo možné použít pojem „*mapa relativních abundancí*“, která je jen jinou reprezentací sloupcového grafu.

Analýza NMDS (str. 77) je vysvětlena nepochopitelně, např. bez definice pojmů „*ekologická vzdálenost*“. Kdyby aspoň bylo uvedeno, že jde o klastrovací analýzu, čtenář by byl klidnější. Ale např. vysvětlení „*V této práci byla použita NMDS analýza ekologické vzdálenosti vzorků spočtené metodou Bray-Curtis.*“ bez odkazu, pouze s odkazem na program Past 3 je nedostatečné, přestože mu předchází mnohoslibný úvod: „*Metoda NMDS (z anglického Nonmetric MultiDimensional Scaling) analyzuje libovolnou metrickou nebo semimetrickou matici vzdáleností nebo podobností (nepodobností). NMDS zobrazuje pozorované vzdálenosti/podobnosti mezi objekty v euklidovském prostoru.*“

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? **ANO** **NE**

Je dokumentace výsledků dostačující? **ANO** **NE** - v čem jsou nedostatky?

Poznámka:

Práce obsahuje pro čtenáře jeden podstatný problém – není jasný vztah části „*Dosavadní výsledky*“ v Úvodu (str. 58-63) k DP autorky. Evidentně jde o pacienty, jejichž data jsou/nejsou? v DP použita a kde se na souboru těchto pacientů definují pojmy jako R/G koeficient a zelené/šedé/červené skupiny, které jsou dále v DP použity. Není uveden žádný literární odkaz vztahující se k datům skupiny v části „*Dosavadní výsledky*“. To je matoucí.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?

Téma je tak komplexní, že samotné systematické uchopení tématu tak, jak ho předvedla autorka, je velmi cenné. K některým závěrům by bylo zapotřebí více dat, což autorka sama uzavírá.

Výhrady mám k legendám obrázků. I u jednodušších obrázků v jiných pracích a publikovaných článcích jsou legendy daleko podrobnější. Především by měly být v legendě vysvětleny označení vzorku: „pacient-rok odběru-přítomnost parodontálního chobotu“. Vysvětlit také význam červených šipek. Věta v legendě „Hodnoty pro jednotlivé osoby jsou rozlišeny barevně“ je matoucí u obr. 9B, kde jsou někteří pacienti vybaveni pouze hodnotou „0“, která ovšem nemůže mít ve sloupci žádnou barvu. Navrhoval bych u A i B oddělit jednotlivé pacienty svíslými čarami.

U obrázku 10 (vývoj mikrobioty u pacienta H5) není přímo v obrázku ani legendě nic o vývoji par. chobotu a v grafu není jeho přítomnost naznačena na rozdíl od obr. 9. Je tam zato hvězdička, jejíž význam není vysvětlen.

Na obr. 11 je vidět, že když jsou sloupečky u jednoho taxonu podobně vysoké ve dvou následujících odběrech, nelze výšky sloupců stanovit. To je nevýhoda 3D grafů s mnoha daty.

Na straně 88 by měly být označeny osoby nově zahrnuté do experimentu (tedy jejich šifry Hxxxx“).

Na obr. 13 jsou zahrnuta data pouze za rok 2016 a nalezeno pro H maximum 30% bakterií červeného komplexu u pacienta H4. Mělo by se ale zároveň připomenout, že tento pacient startoval o čtyři roky dříve s hodnotou kolem 2%. Když jsou časová data k dispozici, měla by se hodnota 30% nebrat automaticky, ale jako extrém s časovým vývojem.

Obrázky 11-16: v legendě by měly být vysvětleny zkratky „CT“ a „HOT“.

Orientaci v Obr. 17 by pomohl rastr pro případ, že by chtěl někdo při analýze obrázku jít za první dojem (=hodně bakterií červeného komplexu u agresivní formy choroby) a analyzovat jednotlivé pacienty, což je z obrázku technicky obtížné. Legenda by mohla být rozsáhlejší, i když je obrázek vysvětlen v textu (nebo se alespoň na text odvolat – takhle zůstává legenda v půli cesty).

Teoretické pozadí obrázku 18 mi připadá vysvětlené nedostatečně, i když je intuitivně pochopitelný.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? **ANO NE**

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? **ANO NE**

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? **ANO NE**

Diskuse je skutečně silnou stránkou této práce a připadá mi výborná. Autorka se všestranně snaží urovnat velmi složitá a někdy mnohoznačná data a porovnat je s literaturou.

Cenná mi třeba připadá část na str. 108, kde je zpochybňována racionalita využití některých souprav k charakterizaci mikrobiomu ústní dutiny, právě na základě výsledků autorky.

Jsou zajímavě diskutována data jednotlivých pacientů, kteří nějak vybočují z charakteristické skupiny.

Je otázka, zda na základě dvou pacientů ze skupiny H, kteří udržovali vysoký poměr R/G a kteří byli označeni jako osoby s výbornou úrovní dentální hygieny (cit: „Toto zlepšení časově přesně odpovídá období kdy osoba H17 začala pravidelně navštěvovat dentální hygienu a celkově zintenzivnila dentální péči.“ (str. 104) nebo „Tato osoba potvrzuje význam prevence a

včasné diagnostiky, neboť se jedná o pracovníka ve stomatologii, u kterého je standardem vynikající úroveň dentální hygieny.(str. 104)) je možné odvážně uzavírat v Souhrnu (str. 111) , že „Pravidelnou a precizní dentální hygienou lze i v případě velice nepříznivého složení orálního mikrobiomu nástup onemocnění oddálit či možná dokonce zastavit.“ Ale vzhledem k omezené velikosti souboru pacientů a jejich datům se to samozřejmě nabízí.

Byl bych trochu skeptický ke tvrzení autorky z Výsledků (str.94).

„Zároveň lze pozorovat poměrně velké množství taxonů, které prozatím nebyly přiřazeny k parodontálnímu zdraví ani k parodontitidě. Při větším počtu vzorků v jednotlivých skupinách bude časem jistě možné přiřadit mnohem více taxonů k jednomu či druhému stavu.“ – jde o výhled autorky do budoucna ohledně charakterizace šedé zóny, která podle mého zůstane šedá a špatně definovaná.

Reálněji autorka vystihuje komplikovaný vztah druhů a nemoci v Diskuzi (str. 109)

„Zcela jistě nejsou aktuálně definované skupiny taxonů přiřazených k parodontálnímu zdraví či parodontitidě definitivní, ovšem s ohledem na metodiku použitou pro definování těchto skupin lze předpokládat, že dojde pouze k jejich rozšíření o další taxony, ale nikoli ke kvalitativnímu posunu.“

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? **ANO** **NE**

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

Přes výhrady k některým rysům práce je jazyková úroveň velmi dobrá až na nečetné anglicizmy. Text se velmi dobře čte.

Ostatní výhrady byly uvedeny výše.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práci považuji za nesmírně cennou. Při podrobném studiu práce je vidět, nakolik je těžké problém bakterií a nemocí parodontu správně uchopit, protože se obdobné práce provádějí na nesrovnatelných skupinách pacientů a s různých rozřazením bakteriálních druhů do skupin „nemoc“ a „zdraví“. Postup, který používá autorka, je konzistentní a velmi cenný.

Cíle práce byly splněny a práce rozhodně splnila svůj účel.

Otázky a připomínky oponenta:

- 1) Jak byly dřívější výsledky – kap. „Dosavadní výsledky“ v Úvodu (str. 58-63) použity ve Vaší práci?
- 2) Které metody prováděla autorka a které někdo jiný (kromě klastrovací analýzy a odběrů, kde je to uvedeno)? Kdo například prováděl sekvenaci metodou Illumina MiSeq, která byla provedena v jiné laboratoři?
- 3) Nakolik mohou být výsledky R/G poměru u pacientů určitou tautologií – nakolik byl R/G poměr definován právě na těch datech, která se prezentovala v práci? Pokud by to tak bylo, nebylo by divu, že R/G poměr vychází pěkně a logicky.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: