

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Hana Španielová

Datum:

2.6.2015

Autor:

Bc. Barbora Gomolčáková

Název práce:

Stratifikácia rizika progresie ochorenia u pacientok s abnormálnym cytologickým nálezom krčka maternice pomocou molekulárno-genetickej analýzy vybraných biologických faktorov.

Cíle práce

V cytologických vzorcích odebraných z děložního krčku sledovat přítomnost metylace tří tumorsupresorových genů spolu s infekcí vybraných virů a bakterií a ověřit předpoklad, že tyto biologické markery mohou zvýšit citlivost *screeningu* při HPV testování u osob s výskytem těžké předrakovinné léze.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 83

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

Literární přehled:

Odpovídá tématu?

ANO, ale věnuje se převážně učebnicovým poznatkům o relevantních virech. Bohužel i informace, které jsou důležité pro formulování cílů této práce (tzn. souvislost jednotlivých patogenů s cervikálním karcinomem) pocházejí většinou z jediného přehledného článku a v některých případech nejsou opatřeny citací vůbec (viz. Přípomínky). Řadu publikovaných dat autorka v literárním přehledu neuvádí, přestože (protože?) je používá a řádně cituje v diskuzi. Vzhledem k tématu práce, pokládám informace v kapitole 4.4.4 za nedostatečné a celkově postrádám souhrnné srovnání specifity a senzitivity molekulárně-biologických metod používaných dnes ve výzkumu a klinické praxi pro detekci pre-kanceróz u cervikálních lézí.

Je napsán srozumitelně? ANO

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

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

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito?

Jedná se o práci s klinickým zaměřením, proto autorka pracovala téměř výhradně s komerčními sadami určenými pro izolaci a detekci cílových genů/patogenů. Metody jsou založeny na detekci DNA a RNA pomocí izotermálních metod (TMA – transkripce zprostředkované amplifikace), PCR, qPCR a hybridizace nukleových kyselin. Použita byla i multiplexová metylačně specifická qPCR.

Jsou metody srozumitelně popsány?

Metody jsou někde řazeny poněkud chaoticky podle typu detekční metody (PCR, hybridizace, atd.), nikoliv podle typu detekovaného genu/genomu/viru. Označení metody jako „CNS“ na str. 62 je matoucí. Kapitola obsahuje nadbytečné tabulky uvádějící objemy roztoků nebo vzorků, ale zcela postrádající jakoukoliv informaci o koncentracích vstupních komponent (např. testovaných DNA/RNA). U popisu laboratorních postupů se většinou jedná jen o podrobný přepis návodu výrobce a možná by tak stačilo uvést pouze typ a katalogové číslo dané soupravy. Naopak, kapitola neobsahuje žádný seznam použitých primerů – čtenář by musel sekvence dohledávat v citované literatuře.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů?

ANO, ale hlavní kapitola výsledkové části, kap. 6.4. by zasloužila lepší slovní popis. Domnívám se, že by zde, a nikoliv v kapitole Metody, měla být uvedena nulová hypotéza, její zdůvodnění a závěr k příslušné hypotéze.

Je dokumentace výsledků dostačující?

ANO, ale kapitola zcela postrádá obrazovou dokumentaci, která by čtenáři dala přehled o tom, jak vyhodnocení testů probíhá.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

Množství experimentů ano, ale provedené vyhodnocení NE. Práce si kladla za cíl sledovat „výskyt metylace a infekce v souvislosti se vznikem těžké předrakovinné HPV pozitivní léze“, ale toto srovnání nebylo provedeno – metylační status v souvislosti s infekcí a ko-infekcí více patogeny nebyl vůbec vyhodnocován! Podle mého názoru bylo možné ze získaných dat vytěžit více informací.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků?

ANO, ale je zde poněkud neorganicky začleněna kapitola 7.1. Kvalita a kvantita DNA, jejíž smysl mi uniká (viz Otázky) a některým aspektům práce se vůbec nevěnuje (viz Otázky).

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

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

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné?

ANO, ale není zřejmé, na jakých výsledcích uvedených v této práci zakládá autorka konstatování ve čtvrtém bodě: „Detekcia metylácie analyzovaných TSG dokáže vyselektovať pacientky v riziku iba do určitej miery. Stále to nie je postačujúci marker, ktorý by dokázal zvýšiť špecifickosť HPV testovania na potrebnú úroveň.“

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

Dobrá, jazykovou úroveň nemohu hodnotit.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Hlavní cíl práce byl splněn. Autorce se podařilo vyšetřit různými molekulárně-biologickými metodami celkem 51 vzorků od pacientek s detekovanou cervikální lézí ve stádiu CINIII+ a stejný počet vzorků od zdravých kontrol na přítomnost vybraných patogenů a na metylační status promotorů vybraných tumor-supresorových genů. Přestože se nepodařilo prokázat, že by vybrané mikroorganismy mohly sloužit jako pomocný biomarker pro zvýšení citlivosti HPV testu, přispěla tato diplomová práce k rozšíření poznatků nutných pro rozvoj

onkologické diagnostiky.

Tato práce splňuje požadavky kladené na práci diplomovou a doporučuji ji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

- a) Postrádám citace k několika informacím v literárním přehledu. např.:
 - na str. 37 (dole): „Prenos EBV je možný aj pohlavným stykom. Epitel KM obsahuje receptory pre EBV a je tiež zdrojom šírenia vírusu.“;
 - na str. 38: „CMV patrí k najfrekventovanejším vírusom infikujúcim genitálny trakt. Od 60. rokov je preto študovaný pre jeho možnú úlohu vo vývoji KKM.“
 - na str. 46: „Pre tieto, ale aj mnohé iné fakty je CT neustále hojne študovaná ako možný biologický kofaktor pri vzniku / progresii KKM.“...Jaká jsou ta další fakta??
- b) Originál Obrázku č. 12 pochází z jiného zdroje, než je ten, který je citován.

Otázky:

1. Prosím o vysvětlení informací v kapitole 7.1. Kvalita a kvantita DNA a zdůvodnění jejího zařazení do kapitoly Diskuze. Z práce vyplývá, že veškeré izolace nukleových kyselin byly prováděny ze stěrů. O jaký bezbuněčný materiál se tedy jednalo?
2. V diskuzi na str. 67 je uvedeno „Podľa očakávania bol vplyv na progresiu karcinogenézy potvrdený u metylácií promótorov. Podľa zisteného metylačného statusu by bolo z našich vzoriek vyradených 48 % pacientiek. Viac ako polovica z nich by však bola označená za rizikové, pričom je takmer vylúčené, aby sa u všetkých týchto žien v budúcnosti vyvinul karcinóm.“ Jak lze z pouhého stanovení přítomnosti metylace promotorů usuzovat na její vliv při progresi karcinomu? Sledujete pacientky prospektivně? Nemetylované promotory byly zjištěny u 24 pacientek - na základě čeho by byla část těchto pacientek označena za rizikové? V práci to není uvedeno!
3. V Souhrnu na str. 75 je uvedeno „Detekcia metylácie analyzovaných TSG dokáže vyselektovať pacientky v riziku iba do určitej miery. Stále to nie je postačujúci marker, ktorý by dokázal zvýšiť špecifickosť HPV testovania na potrebnú úroveň.“ Jaký typ výsledků popsanych v práci vede k tomuto závěru?
4. Pro analýzu metylací promotorových oblastí bylo vybráno několik genů. Na základě čeho byly vybrány přímo tyto geny? Hrají nějakou roli v etiologii onemocnění? Jakou?
5. Jak si lze vysvětlit fakt, že u nádorových vzorků byla detekována přítomnost polyomavirů pouze v 19% a vůbec nebyla potvrzena přítomnost BK viru, přestože v citovaných studiích je prevalence polyomavirů ve stejně závažných lézích až 44% a většinu z detekovaných polyomavirů tvoří právě BK virus? Podařilo se vám detekovat použitou diagnostickou sadou BK virus z jiných vzorků/tkání? Jak byly obecně prováděny kontroly při detekci?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: