

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Dominiky Veselé na téma „HLA typizace v klinické praxi – využití k testování predispozic k onemocnění autoimunitního typu“.

Dominika Veselá ve své práci obsáhle shrnula problematiku HLA typizace, vztahu konkrétních alel k predispozicím k autoimunitním chorobám, komplexně a podrobně se věnuje celiakii. Zmíněná témata popisuje obsáhle, v problematice se dobře orientuje, práce je napsána prakticky bez chyb (našel jsem jen tři drobné chyby!). Práce má standardní členění, neskutečné množství citované literatury (307 prací) je uvedeno i odkazováno správně. Nadstandardní rozsah je někdy znát na uvedených poznámkách – informace jsou vršeny za sebe, někdy si protiřečí, častěji se opakují již jednou (mnohokrát) uvedené informace; myslím, že by někdy určité zeshčlenění přispělo k větší srozumitelnosti, nicméně studentka prokazuje velkou schopnost pracovat s textem

Negativem práce je nedostatečný (vlastně chybějící) popis vzorků, které studentka v laboratoři vyšetřila a nesmyslné statistické hodnocení vzorků z českobudějovické laboratoře (viz dále). Je ale znát, že Dominika o této okolnosti věděla a snažila se práci „dohnat“ na ostatních částech.

K práci mám několik otázek a připomínek (prosím odpovězte jen na ty zvýrazněné):

- již v anotaci se uvádí, že v ČR chybí dostatek populačních studií zabývajících se celiakií a díky získaným datům bylo možné se takovou studií zabývat; toto je opravdu přehnané tvrzení
- doporučil bych sjednotit a ujasnit používání zkratk HLA a MHC – uznávám, že tyto zkratky se používají velice promiskuitně, ale HLA je vysvětleno jako Human Leukocyte Antigen, jindy jako Soubor genů důležitých k rozeznání cizích povrchových struktur buněk, u MHC doporučuji překládat jako Hlavní **histokompatibilní** komplex (zde ovšem chybují všichni a všude :)
- na str. 14 popisujete rozdíl mezi fází cis a trans; dodáváte, že většinou jsou alely (...) v cis konfiguraci nebo také v trans konfiguraci :)
- pro tkáňovou transglutaminázu používáte zkratku TG2 (str. 15 a dále) a také zkratku tTG (str. 16 a dále), což rozhodně nepomáhá pochopení textu; kromě toho výraz „enzymová tkáňová transglutamináza“ je nesmyslný
- na str. 17 definujete lepek jako směs prolaminů a glutelinů, o dvě věty dál jako souhrn prolaminů
- str. 19 – dvanáctník je duodenum, ne jejunum
- str. 26 a 27 - Downův syndrom není autoimunitní choroba. Stejně tak myslím není vhodné mluvit o Downovu, Williams-Beurenovu a Turnerovu syndromu jako o „přidružených chorobách“ k celiakii, z logiky věci by to spíše mělo být obráceně. Prevalence Downova syndromu u neselektované populace je 20 na 10.000, tedy 0,2%, **je to skutečně významně méně než u populace celiaků? Existuje shoda na této asociaci ve více studiích?**
- str. 28 a dále – Alopecia areata je onemocnění typické ostře ohraničenými ložisky se ztrátou vlasů (viz název).

Literatura - byla tam DQ5... ?

- *některé české autory uvádíte s vysokoškolskými i akademickými tituly včetně celého názvu pracoviště. Máte proto nějaký důvod (třeba se s nimi dobře znáte)?*

str. 31 – *píšete, že „Předmětem debat zůstává, zda program pro screening zaměřit na obecnou populaci symptomatických nebo i asymptomatických osob“ - opravdu? Domnívám se, že screening probíhá již dlouho u symptomatických osob.*

- str. 32 nesrozumitelně podáváte fiktivní rozhovor MUDr. Nevorala (prof. MUDr. Csc.-!) a MUDr. Frühaufa; Nevoral cítí naléhavou potřebu screeningového programu, souhlasí, že plošný screening je neopodstatněný, ba dokonce kontroverzní...

- str. 34 – prosím, co je pamflet ESPGHAN s roku 2012? A proč je to pamflet (=hanopis)?

- str. 37 – vysvětlíte, prosím, pojem vitální barvivo; ve vašem případě se živé buňky vitálním barvivem nebarví.

- kapitola 6.2 – popis každé molekulárně biologické metody začíná odstavcem, kde jsou naprosto okrajové či zavádějící informace (zejména 6.2.1, ale i další), ačkoliv nakonec jsou metody (zejména Real-Time PCR, chválím!) popsány dobře.

- str. 39 - nemůžete v roce 2019 hodnotit vhodnost molekulárně genetických metod na základě publikace z roku 1997!

- str. 40 – q-PCR není totéž, co Real-time PCR, navíc tuto metodu z hlediska kvantifikace ani obecně nepopisujete ani později nepoužíváte

- str. 41- 44 popisujete metody NGS. Jednak vlastně nevím proč, jednak tak činíte velice nepřesně a chybně, zejména protože citujete hodnocení metod z publikací starých 10 – 15 let. Nejvíce mě zaujala práce o platformě Illumina z roku 1998, tedy z doby několika let před uvedením tohoto systému. Ne, práce Ewing et al. z roku 1998 vůbec nepojednává o jakémkoliv NGS, naopak popisuje analýzu dat z původních sangerovských sekvenátorů ABI. Metody NGS rozhodně nejsou rychlejší, uvádíte zde další nepřesnosti a chybné informace. V roce 2019 musíte čerpat z recentních zdrojů.

- na str. 46 – 50 popisujete izolaci DNA. Nejdříve popisujete izolaci kitem DDK3/DDK50. ***Jaký je použitý princip izolace tímto kitem?*** Dále popisujete izolaci kitem GeneAll ExGene – předpokládám, že v tomto případě se jednalo o vazbu na silikáty. Píšete, že tento kit byl používán od roku 2018 – ***Vy jste používala jaký kit? A které vzorky jste zpracovala (prováděla detekci HLA alel) Vy osobně?***

- na str. 48 – 50 popisujete izolaci z bukalního stěru a z krve pomocí naprosto stejného kitu, opravdu nebylo nutné dvakrát za sebou opisovat stejný protokol.

- na str. 51 představujete komerční kity vhodné k typizaci alel. ***Jak jejich výběr probíhal? Proč je mezi nimi Eurex Medica s.r.o. - není to Trade Mark, jak uvádíte, ani výrobce kitu; Eurex Medica distribuuje typizační kity firmy R.O.S.E- Europe GmbH, kterou již máte uvedenu v tabulce. Proč zde uvádíte HLA-B SSP Kit, když Eurex Medica nabízí 26 různých souprav pro HLA typizaci? Uvedené kity označujete jako vhodné k typizaci, jsou jiné neuvedené nevhodné?*** Kromě toho zde nejsou uvedeny kity ani výrobci, které používáte ve své práci.

- na str. 54 popisujete rozšířenou gelovou elektroforézu. Jak se odlišuje od nerozšířené?

- v kapitolách 8.1.8, 8.1.9 a 8.1.10 popisujete vizualizaci elektroforézy, opakovaně uvádíte použitý software a jeho popis.

- první část výsledků tvoří kazuistika Vaší kolegyně - celkem vyšetřeno 13 příbuzných jedinců. Popis kazuistiky je opravdu příliš podrobný: Znovu (už zase) se definuje pojem **celiakie, osobní a rodinná anamnéza, sociální aspekty (posměšky ve škole, nervozita učitelů)** – nevím, jestli jste tyto údaje plánovala využít ve statistickém hodnocení.

- druhou část výsledků tvoří dotazníkové hodnocení všech pacientů vyšetřených v laboratoři GENLABS s.r.o. . Bylo by vhodnější použít termín „účastníci“ nebo jiný, protože termín pacient evokuje jedince, který trpí určitým zdravotním problémem. **Měli Tito účastníci nějaký definovaný zdravotní problém?** Všechno bylo od r. 2014 283, odmítlo kontakt nebo nevedlo e-mail 183, ze zbylých 100 odpovědělo 51, a u těch 27 s výsledky nijak dál nepracovalo (žádné další vyšetření). Zbylo tedy 24 účastníků, z nichž 21 celiakií netrpí a 3 ano.

- na str. 70 píšete, že z tabulky a z kazuistiky se podařilo dokázat multifaktoriální profil **autoimunitních chorob. To si rozhodně nemyslím, v tabulce máte zkrátka znaky, které nijak zásadně nesouvisí se sledovanou nemocí.** Co mne opravdu překvapuje, že pro další účely označíte pacienty vyšetřené v laboratoři jako za případy se suspektní diagnózou celiakie. U těchto pacientů nikdo takové podezření nevyslovil. Další statistické hodnocení je nesmyslné; v dalším textu hodnotíte všech 283 pacientů, přičemž u nich znáte jen pohlaví a věk, jakoukoliv informaci o jejich klinickém stavu máte u 24 jedinců, tedy u 8,5 %.

- dále hodnotíte skupinu 70 pacientů, která Vám byla poskytnuta z pražských pracovišť. Byly to výsledky vyšetření nebo DNA pacientů?

- na str. 79 (a i dříve) uvádíte, že celiakie je způsobena genetickými a environmentálními vlivy; to není zase tak překvapivé, to lze tvrdit o téměř všech znacích.

- v diskusi osvětľujete původ účastníků dotazníkové akce a kriticky přiznáváte, že jste z několika odpovědí udělala statisticky neprůkazný závěr, abyste dále a znovu nekriticky prohlásila, že jste potvrdila teze o souhře predisponujících genů a environmentálních faktorů. Šestistránková diskuse je dobře zpracována.

Práce Bc. Dominiky Veselé obsahuje velké množství vyčerpávajících informací, je dobře zpracovaným textem na téma klinické diagnostiky celiakie. Za velkolepým teoretickým zpracováním sice zaostává praktická část, věřím však, že po zodpovězení mých otázek budu moci práci doporučit k obhajobě.



Ondřej Scheinost, 19. ledna 2020