

Oponentský posudek

kandidátské disertační práce **RNDr. Martiny Putzové**:

VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍ POLYMERÁZOVÉ REAKCE V RÁSNÉ PRENATÁLNÍ DIAGNOSTICE ANEUPLOIDIÍ AUTOZOMŮ A HETEROCHROMOZOMŮ

Disertační práce je členěna na obvyklým způsobem na část teoretickou a praktickou. Úvod je rozdělen na 6 podkapitol, ve kterých se autorka věnuje zevrubně repetitivním sekvencím, mapování lidského genomu, polymorfismům DNA, STR lokusům, detekci DNA a chromozomálními aberacím. Na stranách 24 - 29 autorka popisuje principy QF-PCR.

V 2. kapitole si autorka vytýčila cíle a stanovila hypotézy, následuje metodika, výsledky a diskuse.

Rozbor disertační práce:

Úvodní část je psaná srozumitelně a na potřebné odborné úrovni. Autorka jednoznačně prokazuje orientaci v dané problematice.

Celá 1. kapitola obsahuje jenom několik drobných nepřesností:

Kapitola 1.6.5. Diagnostika aneuploidií by se dala doplnit o podkapitolu, která se věnuje moderním molekulárním metodám testovaným pro účely prenatální diagnostiky jakými jsou například: pyrosekvence, HRM technika, DNA microarray CGH, SNP kvantifikace pomocí Real-Time PCR apod.

Str. 28: Kapilární elektroforéza se nepoužívá k vizualizaci fluorescenčně značených DNA fragmentů, ale k jejich separaci. K vizualizaci je potřebný zabudovaný laser a potřebná optika se spektrálními filtry.

Cíle práce:

Autorka si v cílech práce stanovuje pracovní hypotézy, které neodpovídají klasickému typu vědecké hypotézy.

Použité metody a postupy:

Celá metodická část je popsána poněkud povrchně na stranách 32 - 35.

Následně uvádím hlavní nedostatky:

Pokud byly vzorky DNA určeny k optimalizačním pokusům, chybí informace o souhlasu těhotných a biologických otců se zaezením do studie.

Autorka rozšířila počet jednotlivých STR lokusů, což se týká tvorby a optimalizace primerových multiplexů, z čehož převzala metodiku od Mann et al., 2004, nebo se o ní v práci vůbec nezmiňuje.

Metodická část postrádá vlastní způsob hodnocení dat získaných z kapilární elektroforézy.

Výsledky a diskuse:

Ve výsledcích autorka prokázala na úctyhodném souboru oprávněnost prenatalního testování metodou QF PCR a rozšířením multiplexu minimalizuje možnost neinformativního výsledku. Dále popisuje přednosti QF PCR a její limity oproti klasické cytogenetické analýze.

Ve výsledcích chybí předehledná provázanost se stanovenými cíli a hypotézami. Chybí statisticky podložené ověření 4. pracovní hypotézy označené jako (3). Autorka se ve výsledcích vůbec nevěnuje hodnocení jednotlivých STR markerů ve vztahu k velikosti repetice, přesto v diskusi na str. 47 uvádí, že její výsledky potvrzují, že by mohly být používány výhradně tetra a penta nukleotidové repetice. Dále autorka uvádí na str. 48, že nelze použít pro kvantifikaci gonozomálních aneuploidí AMELX/Y 432bp/250bp systém. Jedná se o jednonokopiové genuové a pseudogenuové sekvence, které je možné po kalibraci také využívat pro kvantitativní účely.

Přes diskusi o možnostech využívat rutinně v rámci prenatalní invazivní diagnostiky pouze QF PCR popisuje autorka na straně 50 situaci ve Velké Británii (UK), kde je karyotypizace prováděna již jen u cca 15 % odebraných biologických vzorků, protože riziko falešně negativního výsledku je "pouze" 1 : 1500 provedených QF PCR. Pak se však vrací k svým výsledkům a dostává se k prakticky stejnému riziku (1: 1530). Ovšem tentokrát se závěrem, že toto riziko je pořád natolik "vysoké", že QF PCR zůstává v ČR doplňkovou metodou.

Aktuálnost řešení problematiky:

QF PCR je již nezbytnou rutinní součástí většiny DNA laboratoří, které se zabývají prenatalní diagnostikou. Metodiku však aktualizovala.

Dotazy:

1. Které používané markery se významně lišily v heterozygoty naší populace od tzv. uvažované heterozygoty. (Které populace zahrnuje a jaké jsou tyto vzorky v jednotlivých populacích)?
2. Pokud se podařilo analyzovat základním STR multiplexem pouze 1 informativní marker, v jakém procentu by se výsledek bráný pouze z tohoto markeru lišil od výsledku získaného pomocí nadstavbového setu?

Závěrečné hodnocení:

Autorka prokázala v práci význam a opodstatnění použití metody QF PCR v prenatalní diagnostice. Zavedla multiplexovou PCR, která je schopna zachytit aneuploidie 3 autozomů a gonozomu X a Y. Publikovala své výsledky a zkušenosti v časopisech s IF.

Proces, kterým byly výtky k úrovni praktické části splněny dle mého názoru kritéria kladené na disertační práci. Na základě svého kladného hodnocení **doporuuji kandidátskou disertační práci k obhajobě**. Na základě úspěšné obhajoby **doporuuji, aby RNDr. Martiny Putzové byl udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.**