



*Prof. Ing. Zdeněk Sedláček, DrSc.
Ústav biologie a lékařské genetiky
2. LF UK a FN Motol
Plzeňská 130/221
15000 Praha 5
tel. 257296153
<http://ublg.lf2.cuni.cz>*

Olomouc, 1. září 2012

Věc: Oponentský posudek na disertační práci

Vážený pane profesore,

v příloze zasílám svůj oponentský posudek na disertační práci, kterou předkládá Mgr. Patricia Alejandra del Pilar Norambuena Baraquet, Ph.D. - „*MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTICS OF CYSTIC FIBROSIS, HYPERHOMOCYSTEINEMIA-RELATED DISORDERS AND MALE INFERTILITY: VALIDATION AND APPLICATION OF HIGH RESOLUTION MELTING*“

Se srdečným pozdravem!

Doc. RNDr. Radek Vrtl, Ph.D.

Oponentský posudek na disertační práci nazvanou „Molecular genetic diagnostics of cystic fibrosis, hyperhomocysteinemia-related disorders and male infertility: validation and application of High Resolution Melting“, autorka: Mgr. Patricia Alejandra del Pilar Norambuena

Olomouc, 1. září 2012

Práce byla vypracována na *Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol* v rámci pracovní skupiny vedené prof. MUDr. Milanem Mackem, DrSc.

Mgr. Patricia Alejandra del Pilar Norambuena píše z hlediska řešeného tématu poznatky o využití metody HRM při molekulární diagnostice uvedených onemocnění. Dále se podílela na vytvoření souboru doporučení pro validaci této metody pro rutinní diagnostické účely.

Práce je psána velmi srozumitelnou angličtinou, je členěna na kapitoly: Úvod, Cíle disertace, Výsledky a diskuse přiložených publikací a Závěry. Tato kapitola je tvořena prvními 54 stranami, včetně šesti obrázků a čtyř tabulek. Přichází jí Seznam zkratk, který je na straně 9, pak následuje Přehled obsahu. Od strany 55 pokračují kapitoly Reference, Seznam publikací, poster, školení a prezentací a Publikace přílohy. Jak je zřejmé už ze samotného názvu, je tematický rozsah přiložené práce velmi široký. Spojovacím článkem je především využití techniky HRM v diagnostice a její standardizace.

Hodnocení přiložené disertační práce sleduje následující oponentská kritéria:

1/ Úvod do problematiky

Mgr. Patricia Alejandra del Pilar Norambuena přiložila jako disertační práci souhrn výsledků své práce na *Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol*. Práce se zabývá: popisem, epidemiologií a diagnostikou cystické fibrózy, hyperhomocysteinemií a MTHFR, dědičnou trombofilií a opakovanými potraty. V rámci mužské infertility: definicí a klasifikací idiopatické infertility, genetickým pozadím a kandidátními faktory mužské infertility, vyšetřováním polymorfismu ADP-ribosyltransferázy 3. Dále je rozebírána technika HRM včetně možnosti mutančního scanningu genů a pro účely genotypizace.

Jsou řešeny metody validace genetických testů: zajištění kvality v molekulární genetickém testování, validace a verifikace.

2/ Cíle disertační práce



V práci jsou řešeny tři aplikace HRM v klinicko diagnostické praxi u CF, chorob souvisejících s hyperhomocysteinémií a u mužské infertility. HRM technika byla optimalizována a validována pro rychlou a spolehlivou DNA diagnostiku.

1) U CFTR genu byla HRM využita pro scanování v rámci hledání neznámé vzácné mutace pro potvrzení diagnózy.

2) Zavedení HRM u malých ampliconů v rámci genotypizace nejčastějších variant genu MTHFR.

3) Byl studován vliv ART3 varianty rs6836703:G>A na narušení spermatogeneze u české mužské populace.

3/ Aktuálnost zvoleného tématu

Mgr. Patricia Alejandra del Pilar Norambuena s kolegy z Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol v rámci této souborné práce řeší dva velmi aktuální úkoly: ekonomické a přitom spolehlivé vyšetřování sledovaných poruch.

Ekonomičnost vyšetření je zcela zásadní v rámci potřeby snižování nákladů na molekulární diagnostiku. V rámci dalšího aktuálního aspektu řešené práce musím zdůraznit, že uvedené články jsou podkladem pro zavádění systému jakosti i v ostatních laboratořích v ČR.

4/ Stručný rozbor výsledků habilitační práce

Autorka dobře zvládla problematiku uvedených geneticky podmíněných poruch, perfektně ovládla techniku HRM i její modifikace. Dokonale zvládla zásady zavádění systému jakosti.

Kromě jiných prací Patricia Norambuena uvádí čtyři publikace v impaktovaných časopisech, přičemž ve dvou z nich je první autorkou. Je členkou skupiny EuroGentest Validation Group, která má zcela zásadní význam ve standardizaci molekulárně genetických testů v zemích Evropy.

Dokladem pilné a soustavné práce je i přehled deseti posterů a šesti přednášek, kde ve více než polovině je prvoautorkou.

5/ Použité metody v rámci disertační práce

Metoda HRM je velmi účinnou scanningovou a jak bylo v práci dokázáno, i vhodně modifikací, i dobrou screeningovou technikou.

V rámci validačních postupů je zárukou velmi dobré metodické úrovně už samotné členství v EuroGentest Validation Group. Jak již bylo zmíněno, uvedené články se staly podkladem pro zavádění systému jakosti v dalších laboratořích.

6/ Nové poznatky disertační práce

Studentka detailně probrala různé aspekty aplikace HRM, zejména je obtížnost rozlišení mezi homozygotními genotypy (jedná se o logický problém při diagnostice autozomálně recesivních onemocnění).



Zmenšením délky amplikon se zvyšuje schopnost diskriminace mezi genotypy a vzrůstá citlivost HRM techniky.

Varianta rs6836703:G>A je rizikový faktor pro oligozoospermii i v české mužské populaci. Rádi se budeme podílet na potvrzení tohoto zjištění analýzou našeho souboru pacientů.

V rámci validace kvalitativních testů je třeba mít na paměti, možnou existenci nedvou, ale tyto kategorií výsledků (skutečně pozitivních, falešně pozitivních, falešně negativních a skutečně negativních). Validace metod je v publikacích detailně řešena.

7/ Význam pro společenskou praxi a pro další rozvoj oboru

Disertační práce a publikované výsledky jsou dalším krokem ke zdokonalení diagnostických metod vyšetřovaných poruch v České republice. Využití HRM přispívá k ekonomickému a přitom spolehlivému molekulárně genetickému testování a odpovídá podmínkám úhrady diagnostické péče ze strany našich zdravotních pojišťoven. Implementace testu varianty rs6836703:G>A v rámci reprodukční medicíny a zjištění její populační distribuce vzhledem k mužské infertilitě patří k praktickým výstupům této disertační práce. Rozpracování validačních postupů se stalo modelem i pro ostatní laboratorně prováděný systém kontroly jakosti.

Na studentku mám následující dotazy:

1. V úvodu na str. 14 uvádí, že ve Spojených státech je průměrná délka života CF pacienta 32 let. Vzhledem k jistým odlišnostem zdravotnictví v USA a v ČR bych prosil studentku, zda by mohla uvést, jaká je současná situace u nás?
2. Odlišná distribuce mutací v různých etnických skupinách je zřejmá a zcela pochopitelná a zde je statistika z USA velmi příhodná. Citovaná frekvence 1:100 000 u asijských Američanů však neodpovídá citovanému poměru 1 z 90. Který z údajů odpovídá realitě?
3. Na str. 23 v kapitole o mužské infertilitě autorka správně uvádí, že nejvyšší výskyt mikrodelecí chromozomu Y bývá v oblasti AZFc. Studentka uvádí, že tato delece způsobuje azoospermii nebo těžkou oligozoospermii. Nebyly mikrodelece AZFc pozorovány i u některých normospermiků?

Závěr: Disertační práce je vlná a má velmi dobrou vědeckou úroveň. Navzdory širokému tematickému zájmu je práce přehledná a svdčí o rozsáhlém zapojení studentky do aktivit ústavu. Předložené publikace se rovnoměrně zabývají všemi řešenými tématy a prokazují předpoklady autorky k samostatné tvorbě vědecké práce.

Zveřejněné výsledky prošly zásadním kritickým hodnocením v renomovaných časopisech, což jednoznačně svdčí o potřebných znalostech autorky v prezentované problematice i ve studovaném oboru.

Na předložené práci jsem nenašel žádné podstatné nedostatky a mohu ji tak plně doporučit k obhajobě, nebo odpovídá svým obsahem a rozsahem paragrafu 47 odstavce 4 Zákona o vysokých školách (č. 111/1998 Sb).

Na základě výše uvedených skutečností doporučuji tuto práci přijmout v předložené formě k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby doporučit uchazeči udělit akademický titul Ph.D.

Doc. RNDr. Radek Vrt 1, Ph.D.