V Praze dne 30. 8. 2018

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci MUDr. Pavla Tesnera

Název práce: MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÁ DIAGNOSTIKA MARKER CHROMOSOMŮ.

Předkládaná disertační práce MUDr. Pavla Tesnera se zabývá studiem původu malých nadpočetných marker chromosomů (sSMC) s využitím různých molekulárně cytogenetických metod a analýzou jejich fenotypového projevu. Hlavním cílem práce byla korelace klinických, cytogenetických a molekulárně cytogenetických nálezů u souboru pacientů se sSMC, posouzení reálné patogenity a klinického významu jednotlivých sSMC a optimalizace postupu vedoucího ke zpřesnění a zrychlení jejich diagnostiky.

Jedná se o klasickou formu disertační práce. Na stranách 5 a 6 je abstrakt v českém i anglickém jazyce, ve kterém autor shrnuje základní informace o použitých metodách a dosažených výsledcích. Na stranách 9 a 10 je uveden seznam použitých zkratek. Následuje rozsáhlá literární rešerše, ve které autor na základě publikovaných údajů shrnuje recentní poznatky o morfologických typech a frekvenci sSMC, mechanismech jejich vzniku, fenotypových projevech a možnostech jejich detekce. Na straně 39 jsou jasně formulovány dílčí cíle disertační práce. Kapitola „Materiál a metody“ uvádí charakteristiku vyšetřeného souboru a detailní přehled použitých metod. V této kapitole autor rovněž přesně specifikuje, která vyšetření prováděl on sám a které prováděli jeho konkrétní spolupracovníci. V kapitole „Výsledky a diskuze“ je uveden přehledný souhrn dosažených výsledků. V rámci práce byla provedena detailní molekulárně cytogenetická analýza 74 sSMC u 67 pacientů a sedmi příbuzných. Celkem bylo detekováno 70 jedinečných markerů a u 62 z nich byl přesně určen jejich chromosomový původ. Celková úspěšnost použité metodiky tedy byla 88,6%. Součástí této kapitoly je i devět kazuistik, ve kterých autor detailně popisuje postup molekulárně cytogenetických analýz, které vedly k identifikaci příslušných marker chromosomů, hodnotí fenotyp jednotlivých pacientů a nálezy porovnává s údaji publikovanými v příslušných databázích a v odborné literatuře. Součástí výsledků je i návrh modifikace vyšetřovacího algoritmu, který umožňuje spolehlivou a rychlou identifikaci sSMC. V závěru na str. 96 autor shrnuje přínosy práce a poukazuje na význam molekulárně cytogenetických technik (zejména kombinace FISH a aCGH) v prenatální i postnatální diagnostice sSMC.

Disertační práce je po formální stránce velmi pečlivě zpracovaná a obsahuje pouze minimum překlepů. Je přehledně členěná, má 87 stran vlastního textu a je doložena vysokým počtem citací použité literatury (celkem 173 referencí), které svědčí o širokém rozhledu autora v dané problematice. Dosažené výsledky jsou výborně dokumentové. Práce je doplněna 16 ilustrativními obrázky, sedmi grafy a 15 tabulkami. K práci bohužel není přiložen autoreferát.

Disertační práce je doplněna přehledem tří odborných publikací, na kterých se autor podílel. MUDr. Tesner je prvním autorem dvou prací publikovaných v časopisech Cytogenetic and Genome Research (IF 1,354) a Molecular Cytogenetics (IF 1,455). V první práci autoři popisují algoritmus postupu při detekci sSMC a demonstrují jeho efektivitu na čtyřech případech prenatálně diagnostikovaných případů s *de novo* mosaikami se sSMC. Druhá práce představuje „case report“, ve kterém autoři popisují případ chlapce s vývojovým opožděním a s nadpočetným marker chromosomem, který vznikl v důsledku inv dup(5)(p15.33p15.1). Kromě toho je MUDr. Tesner spoluautorem další publikace v časopise Journal of Medical Screening (IF 1,864), která však s tématem disertační práce přímo nesouvisí. U této publikace postrádám přesnou specifikaci vlastního podílu autora.

K práci mám několik formálních připomínek a dotazů, které však významně nesnižují celkově výbornou kvalitu disertační práce:

- Některé informace uvedené v podkapitole „Pacienti“ podle mého názoru patří spíše do výsledků, kde se určité části textu znovu opakují, což práci zbytečně ubírá na čtivosti (například informace o tom, že u tří nepříbuzných osob byly nalezeny dva sSMC je uvedena na straně 40 a pak znovu 2x ve dvou odstavcích na straně 52, atd.).

- V tabulkách č. 4 a 6 nejsou v některých karyotypech uvedeny počty vyšetřených mitos a to ani v případech, kdy se jednalo o mosaiky. V některých karyotypech je uvedena zkratka *mos,* u jiných případů s mosaikami tato zkratka uvedena není. Domnívám se, že popisy karyotypů v tabulkách by měly být jednotné.
- K metodické části bych se autora ráda zeptala, *z jakého důvodu použili malovací sondy od tří různých výrobců a jestli čerstvě připravené cytogenetické preparáty před samotnou denaturací a hybridizací nějakým způsobem ošetřují (ostaršují)?*
- V diskusi na straně 54 autor srovnává frekvenci zastoupení jednotlivých sSMC ve vlastní práci a v databázi dr. Liehra a konstatuje, že zastoupení sSMC v předkládané studii je mírně vyšší než ve zmíněné databázi (30,5% respektive 27,8%). Tuto část diskuse pokládám za nadbytečnou, protože rozdíl není statisticky významný. Kromě toho je velikost obou souborů nesrovnatelná (74 versus 5 160 sSMC), takže hlavní příčinou tohoto zanedbatelného rozdílu ve frekvenci sSMC je velmi pravděpodobně tzv. „chyba malých čísel".
- V případě, že se jedná o kruhový chromosom, měl by správný popis nálezu dle ISCN v kazuistice pacientky A36 na straně 74 být: r(1)(p21.2q12) nebo r(1)(::p21.2→q12::) – *viz. ISCN 2016, str. 73.*
- Jsem přesvědčena, že výsledky práce byly prezentovány i formou abstrakt, přednášek či posterových sdělení na odborných konferencích, avšak tuto informaci v předložené disertační práci bohužel postrádám. *Mohl by autor doložit svojí další publikační a/nebo prezentační činnost?*
- V přiložených publikacích je *de facto* popsáno jen pět konkrétních případů se sSMC, další případy byly reportovány v databázi sSMC. *Připravuje autor rozsáhlejší publikaci výsledků celé studie?*

Dotaz: Doktoranda bych se ráda zeptala, *jestli vidí v budoucnu jako reálnou možnost využití technik masivního paralelního sekvenování v diagnostice sSMC*.

Závěr: Předkládaná disertační práce má výbornou formální i odbornou úroveň. Zvolené téma je aktuální. Práce přináší ucelený pohled na problematiku diagnostiky malých nadpočetných marker chromosomů a stanovení jejich klinického významu. Přináší rovněž cenné nové poznatky, které byly publikovány v příslušné databázi i v odborné literatuře. Za významný přínos práce považuji vytvoření modifikovaného algoritmu pro rychlou prenatální molekulárně cytogenetickou diagnostiku sSMC, který může být využit i v postnatální diagnostice. Použité metodiky jsou moderní a tematicky práce navazuje na současné práce zahraničních autorů. Všechny stanovené cíle disertační práce byly splněny. Dosažené výsledky a forma jejich zpracování včetně přiložených publikací prokazují, že MUDr. Tesner má všechny předpoklady k samostatné vědecké práci.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem doporučuji postoupení práce k obhajobě před komisí a v případě, že bude úspěšně obhájena, doporučuji MUDr. Pavlu Tesnerovi udělit titul Ph.D. podle paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.
Centrum nádorové cytogenetiky VFN a 1. LF UK
Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky
U nemocnice 2, 128 08 Praha 2