

UNIVERSITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a UK 2.LF

V úvalu 84, 150 06 Praha 5

Přednosta: prof. MUDr. Milan MACEK, DrSc.



Telefon: +420 2 2443 3501

Fax: +420 2 2443 3520

E-mail: milan.macek.jr@lfmotol.cuni.cz

POSUDEK NA BAKALÁŘSKOU PRÁCI MILANA POLÁKA (SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ – OBOR ZDRAVOTNICKÝ LABORANT): VYŠETŘENÍ MIKRODELEČNÍCH SYNDROMŮ METODOU FISH

Předložená bakalářská práce byla zadána v roce 2010 a vznikla pod mým vedením na Ústavu biologie a lékařské genetiky 2.LF UK na přelomu let 2010/2011. Práce v laboratoři probíhaly současně pod supervizí MUDr. Pavla Tesnera.

Ústředním tématem a současně i názvem práce je molekulárně-cytogenetická detekce mozaik pomocí fluorescenční in-situ hybridizace. Práce má celkem 86 stran; obsahuje 8 tabulek a 12 obrázků (8 převzatých obrázků, 4 fotografie). Je členěna klasickým způsobem na úvodní a teoretické pasáže (kapitoly 1 a 2), experimentální část (tj. použitý materiál a metody – kapitola 3), výsledky (kapitola 4), diskuzi (kapitola 5) a závěr. Text je ukončen seznamem použité literatury, v němž autor cituje celkem 112 informačních zdrojů, z nichž většinu tvoří články z českých a především cizojazyčných odborných periodik (dostupné z internetu) a odborné monografie.

Ústředním tématem práce je problematika molekulárně cytogenetického vyšetření mozaik. Jde o tematiku, která má velký význam pro genetické poradenství, neboť mozaiky chromozomových aberací představují klinicky i diagnosticky velmi závažný a komplikovaný problém. Metoda FISH, kterou autor prakticky vyzkoušel i detailně popsal ve své práci, zůstane zřejmě nadlouho jedinou spolehlivou vyšetřovací metodou sloužící k identifikaci, resp. přesné verifikaci mozaik, zejména mozaik nízkofrekvenčních.

V úvodní části autor formuluje cíle své bakalářské práce, tj. ukázat postup molekulárně cytogenetického vyšetření metodou FISH a posoudit její možné přínosy i metodická omezení. V druhé části nejdříve shrnuje základní poznatky z klinické cytogenetiky se zaměřením na strukturu a význam pohlavních chromozomů a na popis syndromů, pro které jsou mozaikové nálezy charakteristické. V subkapitolách 2.3 a 2.4 se autor zabývá možnostmi diagnostiky chromozomových aberací v mozaikách, přičemž neopomíná ani složitou problematiku diagnostiky prenatalní. S potěšením konstatuji, že student nevynechal ani problematiku zápisu mozaikových nálezů podle pravidel mezinárodní cytogenetické nomenklatury (ISCN), kterou blíže probírá v subkapitole 2.5.

Kapitola 3 charakterizuje soubor vyšetřených pacientů a seznamuje přesně s postupem molekulárně cytogenetického vyšetření včetně specifikace přístrojů, sond i dalšího použitého laboratorního materiálu. Uvádí přehled všech laboratorních metod, které slouží ke studiu chromozomů.

V části 4 (Výsledky) podává autor přehled výsledků vyšetření všech 11 vyšetřených pacientů, kteří byli indikováni k analýze mozaik. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5 (str. 59), zajímavější případy jsou pak dále rozvedeny a ve dvou případech i obrazově dokumentovány v příslušných textových pasážích (oddíl 4.5).

Většinu analyzovaných případů tvoří suspektní mozaikové formy Turnerova syndromu. Autor však spolupracoval také při záchytu a velmi obtížné identifikaci neobvyklého marker chromozomu

v mozaice. Tento marker chromozom byl identifikován jako derivovaný chromozom 8, ale v době zpracování bakalářské práce Milana Poláka nebylo v silách naší laboratoře tento nálezn dále upřesnit (na dodání potřebných, komerčně hůře dostupných sond čekáme dosud).

V diskusi (kapitole 5) autor shrnuje a zčásti i kriticky hodnotí nashromážděné výsledky. Výstupy práce jsou (v souhlase s laborantským zaměřením celého studia) především metodické. Autor srovnává nálezy získané klasickým cytogenetickým vyšetřením a metodou FISH. Ukazuje přitom, že analýzy FISH podávají (vzhledem k počtu vyšetřených jader) daleko přesnější představu o početním poměru buněk v mozaice, i když většinou nemohou (zejména při použití centromerické sondy) přesně ověřit charakter strukturní aberace (pokud se v mozaice vyskytuje v kombinaci s aberací numerickou). Kromě toho autor upozorňuje a obrazově dokumentuje některá úskalí při hodnocení mozaikových nálezů. Přitom se snaží upřesnit pravidla výběru hodnotitelných interfázních jader tak, aby bylo minimalizováno riziko záchytu falešně pozitivních, resp. falešně negativních nálezů. Všechny základní výsledky práce jsou shrnuty v závěru, v němž autor považuje za nejvhodnější postup při relevantní detekci mozaikových nálezů kombinaci klasického chromozomového vyšetření a metody FISH s centromerickými sondami, ve zvláštních případech i s jinými typy sond. Ostatní molekulárně cytogenetické metody včetně těch nejmodernějších (CGH, array CGH) při detekci nízkofrekvenčních mozaik často selhávají, neboť nezachytí drobné kvantitativní rozdíly v tak vysokém „zředění“.

Celkově lze říci, že Milan Polák si velmi úspěšně osvojil analýzu klasické FISH i M-FISH a při práci v naší molekulárně cytogenetické laboratoři prokázal (jak jsme s Dr. Tesnerem shodně konstatovali) nadprůměrnou dovednost. Dobře si poradil i s nelehkou analýzou vzorků se suspektními nízkofrekvenčními mozaikami, což představovalo značné časové zatížení (vyšetření velkého počtu buněk pod fluorescenčním mikroskopem). Komplexní představu o cytogenetických vyšetřeních si doplnil (pod vedením Dr. Novotné) při stáži v cytogenetické laboratoři FN Motol.

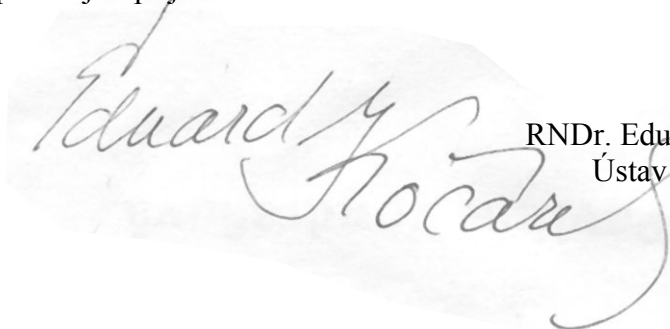
Data, která Milan Polák pořídil, budou dále využita ve startovní fázi grantového projektu TAČR TA01010931, který je věnován optimalizaci počítačového zpracování obrazových výsledků získaných metodou FISH u pacientů s chromozomovými aberacemi v mozaikách.

Kolega Polák rovněž prokázal, že je schopen pracovat s odbornou literaturou, včetně cizojazyčných (převážně anglických) článků v impaktovaných zahraničních periodikách.

Vyšetření 11 pacientů se může zdát na první pohled nedostatečné. Je však třeba uvážit, že autor měl ke své práci vyhrazen jen krátký čas: reálně necelých pět měsíců. V této souvislosti je třeba připomenout, že vyšetření mozaik nepatří (vzhledem k počtu pacientů) v naší molekulárně cytogenetické laboratoři k nejběžnějším. Proto lze jen stěží získat více údajů, z nichž by bylo možné vyvodit obecnější výsledky. Toho si je vědom i autor, a proto v diskusi místy naznačuje, jak by bylo možné problém dále řešit.

K práci nemám zásadní výhrady. Z formálních nedostatků upozorňuji na některé neopravené překlepy (např. hned v obsahu „RAR region“ namísto „PAR regiony“, zalomení textu v půli věty na str. 63, pravopisná chyba „Univerzity Karlovi“ na str. 77, formálně chybná citace pramene „64. LIPPE, B...“ na str. 79 atd.). Kvalitu práce poněkud snižuje i nejasná fotodokumentace některých výsledků (obrázek 9 na str. 63 a obrázek 10 na str. 64). Obecně si myslím, že dokumentace výsledků molekulárně cytogenetických vyšetření mohla být bohatší, i když chápu že reprodukce některých obrázků pro tisk je obtížná. V diskusi bych uvítal více srovnání s recentními literárními prameny, i když smutným faktem zůstává, že problematice vyšetření mozaik je i v současné odborné literatuře věnován nezaslouženě malý prostor.

Navzdory výše uvedeným výhradám považuji práci Milana Poláka za úspěšně završenou, a proto ji doporučuji k přijetí.



RNDr. Eduard KOČÁREK, Ph.D., vedoucí práce
Ústav biologie a lékařské genetiky 2.LF UK

V Praze, dne 21. května 2011