

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

POSUDEK ŠKOLITELE NA BAKALÁŘSKOU PRÁCI LINDY NEUŽILOVÉ
(SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ – OBOR ZDRAVOTNICKÝ LABORANT):

MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ A RELEVANCE VÝSLEDKŮ ANALÝZY FISH U CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ V MOZAIKÁCH

Předložená bakalářská práce byla zadána v roce 2011 a vznikla pod mým vedením na Ústavu biologie a lékařské genetiky 2.LF UK na přelomu let 2011/2012.

Ústředním tématem práce je molekulárně-cytogenetická detekce mozaik pomocí fluorescenční hybridizace *in situ*. V tomto směru práce Lindy Neužilové navazuje na práci Bc. Milana Poláka z minulého roku. Práce proběhla v rámci grantového projektu TAČR TA01010931 a poskytla několik zajímavých dílčích výsledků, které budou využity při jeho dalším řešení.

Práce má celkem 72 stran; obsahuje 25 tabulek, 12 grafů a 14 obrázků (4 převzaté obrázky, 10 fotografií pořízených samotnou autorkou). Je členěna klasickým způsobem na úvodní a teoretické pasáže (úvod a kapitola 1), dále na krátkou kapitolu, kde autorka formuluje cíle a pracovní hypotézy (kapitola 2). Po ní následují materiál a metodika (kapitola 3), výsledky (kapitola 4), diskuze (kapitola 5) a závěr. Text je ukončen referenčním seznamem literatury, v němž autorka cituje celkem 46 informačních zdrojů, z nichž většinu tvoří odborné články z českých a především cizojazyčných odborných periodik, v menší míře i odborné monografie.

Diagnostika chromozomových aberací v mozaikách je tematika, která má velký význam pro genetické poradenství, neboť mozaiky chromozomových aberací představují (vzhledem k rozsáhlé variabilitě fenotypových projevů u pacientů) klinicky i diagnosticky velmi složitý problém. Metoda FISH, kterou autorka prakticky ověřovala ve své práci, zůstane zřejmě nadlouho jedinou spolehlivou vyšetřovací metodou sloužící k identifikaci, resp. přesné verifikaci mozaik, zejména mozaik nízkofrekvenčních, kde je méně početný klon přítomen v necelých 10% buněk. Ostatní molekulárně cytogenetické metody včetně těch nejmodernějších (CGH, array CGH, MLPA) při detekci těchto nízkofrekvenčních mozaik často selhávají, neboť v tak nízké početnosti nejsou schopny minoritní buněčný klon zachytit.

V úvodní části autorka stručně charakterizuje zvolenou problematiku a základní cíl své bakalářské práce, tj. prověřit možnosti stanovení mozaicismu metodou FISH a posoudit její relevanci, popř. upozornit na možné problémy při vyhodnocení a interpretaci výsledků. Ve druhé části nejdříve shrnuje základní poznatky z klinické cytogenetiky se zaměřením na mozaiky chromozomových aberací a na popis syndromů, pro které jsou

mozaikové nálezy charakteristické. V subkapitole 1.3 se pak autorka zabývá možnostmi diagnostiky chromozomových aberací v mozaikách, přičemž neopomíjí ani složitou problematiku diagnostiky prenatální. V závěru (subkapitole 1.4) studentka stručně informuje o pravidlech zápisu cytogenetických a molekulárně cytogenetických nálezů podle nejnovějších pravidel mezinárodní cytogenetické nomenklatury (ISCN 2009). Následující kapitola 2 přesněji formuluje a konkretizuje cíle a hypotézy práce.

Kapitola 3 charakterizuje soubor vyšetřených pacientek (tab.4) a přesně popisuje postup molekulárně cytogenetického vyšetření. Většinu analyzovaných případů tvoří mozaikové formy Turnerova syndromu, pro srovnání je však zařazen i vzorek od pacientky s normálním karyotypem a vzorek, který podle cytogenetického vyšetření obsahoval pouze buňky s karyotypem 45,X. Autorka také přesně specifikuje použité přístroje a pomůcky (viz 3.2), reagentie (viz 3.3) i sondy (viz 3.7.1).

V části 4 (Výsledky) podává studentka přehled výsledků vyšetření všech vzorků. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 9 – 25 a v grafech 1 – 12. Obrázky 5 – 14 pak dokumentují typické výsledky FISH, včetně ukázek hodnotitelných i nehodnotitelných jader, resp. agregátů metafázních chromozomů.

V diskusi (kapitole 5) autorka shrnuje, srovnává a zčásti i kriticky hodnotí nashromážděné výsledky. Výstupy práce jsou (v souhlase s laborantským zaměřením celého studia) především metodické.

Autorka hodnotí a srovnává zejména výsledky FISH získané použitím jedné centromerické sondy pro chromozom X s nálezy vyšetření stejných vzorků pomocí kombinace dvou sond (centromerické a lokus specifické – obě na chromozom X), přičemž uvedené centromerické sondy byly od dvou různých výrobců. U tří vzorků byly k dispozici též výsledky získané klasickým cytogenetickým vyšetřením, takže je bylo možné srovnat s výsledky FISH. Kromě tohoto základního úkolu srovnává autorka výsledky vyšetření stejných vzorků dvěma různými zpracovateli a všimá si také kvality hybridizačních signálů u jednotlivých vzorků, resp. sond.

Autorka (v souhlase s již publikovanými pracemi) potvrzuje, že výsledky analýzy FISH poskytují (vzhledem k počtu vyšetřených jader) poměrně přesnou představu o početním poměru buněk v mozaice. Tuto přesnost lze zřejmě zvýšit aplikací dvou sond pro různé lokusy téhož chromozomu (v našem případě centromery a lokusu KAL na Xp), což vyloučí možné falešně pozitivní nálezy nízkofrekvenčních mozaik. Je zajímavé, že centromerické sondy od různých výrobců (byť výrobci deklarují, že hybridizují se stejným lokusem DXZ1) mohou v některých případech (zejména při hraniční kvalitě vzorku) poskytovat signály o značně rozdílné intenzitě.

V závěru se autorka snaží posoudit možné rozdíly ve výsledcích způsobené osobou hodnotitele. Proto srovnává své výsledky s výsledky vyšetření stejných vzorků zkušenou zdravotní laborantkou Bc. Annou Cinkajzlovou, která v naší laboratoři připravovala bakalářskou práci v minulém roce a také nadále se (jako studentka Přírodovědecké fakulty UK) věnuje metodě FISH. Linda Neužilová ukazuje, že u kvalitních vzorků jsou rozdíly ve výsledcích obou hodnotitelek minimální. Větší diskrepance existuje u vzorků horší kvality, kde se zřejmě výrazněji prosazuje individuální pohled hodnotitelek (při rozhodnutí zda některá jádra a mitózy s nejasnými signály zařadit či nezařadit do vyšetřovaného souboru). Je samozřejmě otázka, nakolik je toto vysvětlení dostačující. Osobně si myslím, že zejména v této části se autorka mohla nad rozdíly ve výsledcích více zamyslet.

Práce je logicky a přehledně členěna, což umožňuje dobrou orientaci v textu. Po formální stránce ji pokládám za zcela vyhovující, teoretickou část hodnotím (ve srovnání s ostatními pracemi z minulých let, které jsem měl možnost vést či oponovat) jako nadstandardní. V textu jsem nenalezl závažnější jazykové chyby, na drobnosti jsem při závěrečné revizi práce autorku upozornil. Studentka prokázala schopnost syntetizovat údaje z různých literárních zdrojů (včetně cizojazyčných – anglických) a připravit z nich přehlednou a kvalitní rešerši.


Linda Neužilová si velmi úspěšně osvojila klasickou analýzu FISH a v naší laboratoři se seznámila i s některými dalšími komplementárními technikami. Dobře si poradila i s nelehkou analýzou vzorků se suspektními či prokázanými mozaikami, a to i se vzorky, které nebyly primárně příliš kvalitní. Studentka samostatně vyhodnotila pro účely práce 24 hybridizací, z nichž u každé musela prohlédnout cca 400 – 600 buněk. Podotýkám, že předtím ještě cvičně vyhodnotila několik dalších vzorků (tyto výsledky samozřejmě nebyly do práce pojaty). Dalších 30 dat (výsledků práce A. Cinkajzlové a výsledků cytogenetického vyšetření) použila ke srovnání a k diskuzi. Své výsledky přehledně ztvárnila tabelární a grafickou formou.

Autorka si uvědomuje, že nashromážděná data nejsou pro komplexní posouzení problematiky a vyvození obecnějších závěrů dostatečná a že její práce spíše naznačuje možné směry dalšího výzkumu. Tento fakt také ve své práci kriticky uvádí. K tomu jen dodávám, že vzhledem k časovému rámci bakalářské práce (necelý semestr) ani nebylo možné získat více dat.

Je třeba připomenout, že práce studentky byla zkomplikována dvojitým stěhováním molekulárně cytogenetické laboratoře – nejprve z FN Motol do provizorních prostor na Plzeňské, pak (po rozjetí činnosti laboratoře) opětným a nečekaným přesunem z provizorních prostor do dodatečně uvolněné místnosti.

Při práci v laboratoři, resp. při ovládání pomůcek a přístrojů a při manipulaci se vzorky prokázala Linda Neužilová dobrou manuální schopnost – nezbytnou „devizu“ každého zdravotního laboranta. Jak ukázaly již první koncepty teoretické části, bylo již od počátku zřejmé, že studentka umí vyhledat relevantní literární zdroje (jak české, tak i cizojazyčné) a pracovat s odbornými informacemi. Je škoda, že tuto svoji dovednost ve větší míře nezúročila i při diskuzi výsledků, kde zůstaly jisté rezervy a zejména závěr diskuze zůstává poněkud „nedotažený“.

Celkově však hodnotím práci kladně a konstatuji, že zcela splňuje požadavky kladené na bakalářské práce tohoto typu. Kromě nedostatků, na které upozorňuji v předchozím textu, nemám k práci jiné připomínky, a proto ji **jednoznačně doporučuji k úspěšné obhajobě.**



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

Praha, 15. května 2012