

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: **Studium extracelulárních nukleových kyselin v mateřské cirkulaci u patologické a fyziologické gravidity**

Autor práce: Mgr. Lenka Žejšková
Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta

Hlavním cílem disertační práce bylo studium extracelulárních nukleových kyselin v mateřské cirkulaci a rozšíření jejich diagnostického využití pro účely neinvazivní prenatalní diagnostiky. Autorka práce sledovala šest metodických cílů: 1) Určit délku fragmentů fetální a celkové extracelulární DNA přítomné v mateřské cirkulaci a zvážit možnost zkoncentrování extracelulární fetální DNA ve vzorku pomocí izolace jednotlivých frakcí, 2) Porovnat zastoupení fetálních buněk v zánětlivé a nezánnětlivé tkáni u pacientek s revmatoidní artritidou, 3) Určit populační variace v počtu kopií DYS-14 sekvence (na Y chromozomu) a posoudit vliv tohoto polymorfizmu na kvantifikaci mužské fetální extracelulární DNA v mateřské plazmě, 4) Studovat telomery v mateřské plazmě a posoudit možnosti jejich využití pro účely neinvazivní prenatalní diagnostiky, 5) Detekovat univerzální fetální marker, hypermetylovaný RASSF1A, v mateřské plazmě a otestovat senzitivitu, specificitu a korelaci se SRY markerem u těhotných žen s plodem mužského pohlaví, 6) Kvantifikovat extracelulární fetální a celkovou DNA v mateřské cirkulaci s využitím RASSF1A, SRY a GLO markerů u gravidit s patologickou placentací a posoudit možnost predikce pozdějšího rozvoje závažných těhotenských komplikací souvisejících s placentární insuficiencí (preeklampsie a intrauterinní růstová retardace).

Výstupem této disertační práce je 5 původních prací v zahraničních časopisech s faktorem impaktu $IF > 1,9$, nejvyšší má $IF \sim 3,0$. Autorka je uvedena jako první autor na jedné z nich (práce s nejvyšším impakt faktorem). Dále jedna publikace, kde autorka figuruje rovněž jako první autor, je připravena k publikaci.

Samotná práce je rozdělena do osmi kapitol: 1. Úvod, 2. Literární přehled, 3. Cíle práce, 4. Souhrn použité metodiky, 5. Výsledky a Diskuze, 6. Závěr, 7. Reference - seznam použité literatury (70 citací), 8. Seznam publikací. Kapitólám předchází Poděkování, Obsah a Seznam použitých zkratk a výrazů. Dizertační práce obsahuje 5 obrázků a 1 tabulku.

Dizertační práce obsahuje všechny náležitosti. Nejsou v ní zásadní formální chyby. Poněkud stručný je na pouhých 9 stránkách a pouze s 1 obrázkem Literární přehled. Vzhledem k tomu, že práce pojednává o extracelulárních nukleových kyselin v mateřské cirkulaci, příliš sem nezapadá 2. publikace (kde autorka je spoluautorem), analyzující zastoupení fetálních buněk v zánětlivé (synovium) a nezánnětlivé (kůže) tkáni u pacientek s revmatoidní artritidou. Tento článek se sice zabývá fetálním mikrochimérizmem, ale sleduje problematiku autoimunitních chorob a nikoliv patologické a fyziologické gravidity. Dále jeho velkým nedostatkem je fakt, že zde nejsou použity zdravé kontroly. Daleko podstatnější by bylo nalézt takové kompartmenty (jiné než synovium), které by byly dostupné, jak od nemocných, tak i zdravých, a výsledky měření mezi nimi porovnávat. Tento postup by potom měl větší výpovědní hodnotu o roli fetálního mikrochimérizmu u autoimunit. Ze všech výše uvedených důvodů bych tento článek zařadila spíše pod čarou.

Předložená disertační práce se zabývá velice atraktivním tématem: možností analýzy extracelulární DNA v mateřské cirkulaci a jejího využití pro účely prenatální diagnózy. Zatímco variace v počtu kopií DYS-14 sekvence a délka telomer se neukázaly jako zcela vhodnými markery pro určení koncentrace fetální extracelulární DNA, stanovení univerzálního fetálního markeru, hypermetylovaného promotoru tumor supresorového genu RASSF1A, se jeví přínosem především pro kvantifikační studie a gravidity s ženským pohlavím plodu. Detekce odlišné hladiny metylace ve fetálních a mateřských buňkách je dostatečně senzitivní a specifická pro účely prenatálního skríningu. Obecně, hledání nových přístupů s cílem zavedení neinvazivní prenatální diagnostiky genetických chorob se považuje za velice ambiciózní a významný projekt v lékařské genetice.

Dotazy a připomínky k disertační práci:

1. Na stranách 26-28 diskutujete o roli fetálního mikrochimérizmu u autoimunitních a nádorových onemocněních. Má fetální mikrochimérizmus také nějaký význam u transplantací?
2. Na stranách 13-14 rozebíráte problematiku analýzy rozdílného metylačního stavu mezi matkou a plodem. Na stránkách 34-35 pak srovnáváte marker SRY na Y chromozomu versus univerzální fetální marker RASSF1A a konstatujete, že při použití markeru RASSF1A naměříte nižší koncentraci fetální DNA v mateřské krvi a že tato nevýhoda je pravděpodobně způsobena ošetřením izolované DNA restrikcí enzymem. Dala by se tato obtíž překlenout zavedením jiné metody na určení úrovně metylace (např. kvantitativní metylačně-specifické PCR)?
3. Z uvedené kazuistiky (obrázků 3-5) vyplývá, že u fyziologické gravidity se detekuje přibližně 200 kopií/ml fetální DNA a kolem 10 000 kopií/ml celkové DNA v mateřské plazmě. Kolik kopií/ml celkové DNA v plazmě se nachází u netěhotné ženy v reprodukčním věku?

Závěr: Disertační práce je prezentována v pěti původních pracích publikovaných v zahraničních časopisech s faktorem impaktu $IF > 1,9$. Autorka je uvedena jako první autor na jedné z nich. Tato prvoautorská publikace, uveřejněná v zahraničním časopise s impakt faktorem $IF \sim 3,0$, otevírá nové možnosti neinvazivní prenatální diagnostiky. Disertace splňuje tedy všechna kritéria, a proto doporučuji udělení titulu PhD.

Posudek vypracován: 21. 10. 2011



Doc. MUDr. Marie Černá, CSc.
Ústav obecné biologie a genetiky
3. LF UK Praha