

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Petry Pírkové

FETÁLNÍ MIKROCHIMÉRISMUS U GYNEKOLOGICKÝCH MALIGNIT

Katedra antropologie a genetiky člověka, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D., 3. LF UK

Předkládaná práce, jež byla vypracována v Laboratoři molekulární biologie a patologie buňky při Gynekologicko-porodnické klinice 3. LF UK, studuje možnosti využití existence fetálního mikrochimérismu diagnostice nádorových onemocnění, případně jako nástroj prognostický.

Mikrochimérismus je stav, kdy se v jednom jedinci vyskytují dvě či více buněčných populací geneticky odlišných. Může k němu dojít po krevních transfuzích, transplantaci orgánu či během těhotenství. Právě fetální mikrochimérismus (FM) je předmětem studia autorky.

Práce o rozsahu 96 stran je členěna do 9 hlavních kapitol a dále seznamu v textu použitých zkratk, citovaných literárních pramenů a příloh. V příloze je prezentováno 7 grafů a v textu 19 tabulek. Teoretický úvod je poměrně rozsáhlý, neboť čítá 47 stran, vlastní práce je prezentována na 32 stranách (plus dalších 12 stran seznamu literatury a příloh). Práce je opatřena českým abstraktem a klíčovými slovy; v anglickém jazyce tyto části chybí.

V *Úvodu* autorka na necelých dvou stranách shrnuje, co je mikrochimérismus a jaké v dnešní době existují pohledy na jeho význam a úlohu při vzniku některých chorob. Zmiňuje také možné využití přítomnosti fetálních buněk v krevním oběhu matky pro neinvazivní prenatální vyšetření, které by mohlo nahradit vyšetření invazivní, např. amniocentézu. Celý *Úvod* je bez odkazů na literární prameny.

Členění kapitol v *teoretickém přehledu*, jenž následuje po *Úvodu*, je logické, obsah literárního shrnutí dostatečným způsobem pokrývá studovanou problematiku a dokládá dobrou orientaci autorky v zadané problematice. Kapitola 2 je věnována fetálnímu mikrochimérismu a jeho možnému spojení s autoimunitními či nádorovými onemocněními. Kapitola 3 charakterizuje a klasifikuje gynekologické malignity a blíže se věnuje nádorům endometria, prsu a vaječníků, jež jsou také cílem studia autorky. Zbytečně často autorka opakuje vysvětlení tzv. TNM klasifikace. Poslední kapitola, kapitola 4, popisuje metody detekce fetálních buněk.

Následuje kapitola *Cíle*, která však cíly v pravém slova smyslu není. Mnohem přesněji by ji bylo možné nazvat shrnutím, s jistými výhradami by mohlo jít i o anotaci či závěr.

V kapitole 6, *Materiál a metody*, je uveden popis vzorků, s nimiž autorka pracovala, a to hluboce zmražené tkáně, nativní tkáně nebo buněčné kultury. Zdá se mi poněkud nešťastné, jakým způsobem autorka charakterizuje vzorky/pacientky, neboť veškeré údaje o vzorku, nádoru i klinická data pacientek jsou vypsány v textu, což je značně nepřehledné. Alespoň v některých případech by jistě velmi pomohla tabulka shrnující dostupné údaje.

Výsledky prezentují data sledující vztah fetálního mikrochimérismu a diagnózy, prognózy (dle stupně diferenciacie nádoru a dle stadia nádoru) a případnou korelaci mezi FM a věkem v době diagnózy, četností gravidit a BMI. Je velmi obtížné dělat jakékoliv závěry na datech ze skupin pacientek rozdělených dle Dg., když některé čítají 2 či 4 jedince. Autorka hodnotila frekvenci FM u jednotlivých skupin, ale také průměrný počet kopií genu *SRY* na 10^7 buněk celkem. Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl v počtu *SRY* kopií na 10^7 buněk mezi prognosticky příznivějším(?) G1 (medián 0.008) a prognosticky nepříznivým(?) G3 (medián 0.14) stupněm diferenciacie nádoru endometria. (...viz str. 40, definice G1 – G3 tzv. histopatologický grade neboli stupeň diferenciacie)

Kapitola *Diskuze* na třech stranách hodnotí častější výskyt FM, avšak o nižší koncentraci, v tkáních endometria nepostíženého nádorem ve srovnání s odpovídajícími vzorky nádorovými. Po případném dalším potvrzení vyšší koncentrace FM v nádorech G3 (s horší prognózou, tedy kratší dobou přežití(?)) navrhuje autorka zavést stanovení míry FM jako prognostický marker. Naopak, častější výskyt FM v kontrolních tkáních endometria, avšak v nízkých koncentracích, autorka vysvětluje možným protektivním účinkem fetálních buněk, které zde (obdobně jako navrženo u nádoru prsu) mohou fungovat jako tzv. imunologický dozor, a hypotetizuje, že v případě vyšších koncentrací FM zřejmě převáží jeho negativní účinky. V tom případě by se jednalo o jakýsi duální efekt FM, který na poli imunologie není ničím výjimečným. Vzhledem k tomu, že předmětem diplomové práce nebylo stanovení fenotypu fetálních buněk detekovaných prostřednictvím fDNA v nádorech, není možné na základě prezentovaných výsledků určit typ a úlohu těchto fetálních buněk v patogenezi ca endometria.

Z formálního hlediska již některé prohřešky byly zmíněny. Co se jazykové úrovně týče, práce je psána čtivě, v podstatě bez překlepů, zato s občasnými gramatickými chybami (zejm. shoda podmětu s přísudkem). Při použití cizích slov by nemělo docházet k přechylování (str. 32 „... karcinom endometria je charakteristický citlivostí na hormony a nízkým stagem.“) a kde má čeština pro daný výraz vhodný český překlad, měl by být použit.

Otázky týkající se samotného zpracování/experimentálního provedení práce:

- 1) Proč byl gen *SRY* amplifikován v tripletech (u některých vzorků), zatímco *GLO* pouze v singletu?
- 2) Jak byla vytvořena standardní křivka? Co posloužilo jako standardy v dilučních reakcích?
- 3) Jaký má význam porovnávání výsledných dat mezi skupinami pomocí Studentova t-testu a zároveň na tatáž data použít neparametrický test Mann-Whitney? Nerozumím tabulkám č. 11, 13 a 15 – co zde bylo porovnáváno?
- 4) Co vedlo autorku k ověřování závislosti FM na BMI matky? Jaká hypotéza by mohla vysvětlit případnou souvislost?

Na autorku mám několik dalších drobnějších dotazů cílených do teoretické části práce:

- 1) Mohla by autorka vysvětlit termín „vnitřní buněčná masa“ (užitý na str. 14), k níž je s ohledem na míru pluripotence srovnávána mikrochimérická buňka?
- 2) Jaký je rozdíl mezi pojmy „multipotence“ a „pluripotence“?

- 3) Str. 17: Co přesně říká teorie kmenových buněk?
- 4) Vypovídá přítomnost fetální DNA v plazmě/séru matky o feto-maternálním přenosu buněk (čili fetálním mikrochimérismu)? Je možné pomocí QPCR a detekce ffDNA v krvi matky (tedy bez FISH, FCM apod.) vyvozovat závěry o přítomnosti FM či dokonce o asociaci či vlivu mikrochimérismu na nejrůznější (pato)fyziologické parametry jako vznik nádoru, prognóza onemocnění atd.?

V celkovém hodnocení práce je třeba zohlednit významnost tématu a ocenit metodický příspěvek práce, kdy autorka testovala několik způsobů „nakládání“ s tkání (nativní vs. *in vitro* kultivace) a několik typů uchování tkání (hluboce zmražené vs. zalité v parafínu), k čemuž jsem se v posudku nevyjadřovala.

Výše uvedené výhrady a formální nedostatky dle mého názoru nesnižují kvalitu této práce, která splňuje požadavky kladené na diplomovou práci. Práci doporučuji k obhajobě a po úspěšné obhajobě navrhuji hodnocení velmi dobře.

V Praze dne 5.6.2012

RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D.