

Oponentský posudek
disertační práce MUDr. Jana Diblíka
"Studium aneuploidie v gametách a embryích"

Předložená disertace se zabývá zavedením moderních molekulárně cytogenetických metod v reprodukční genetice, se zvláštním zaměřením na aneuploidie. Práce je sepsána klasickou formou na 83 stranách s 25 obrázky a 13 tabulkami a je podložena dvěma původními vědeckými pracemi v renomovaných impaktovaných časopisech a jednou prací, která je v recenzním řízení časopisu Prenatal diagnosis. Součástí disertace jsou kopie publikovaných prací. Dr. Diblík je ve dvou z tří uvedených prací prvním autorem. Z dalších publikačních aktivit lze uvést 4 práce ve sbornících, domácích časopisech nebo monografiích. Uvedených 22 abstrakt však spíše vypovídá o velikosti výzkumného týmu a kvalitě jeho finančního zabezpečení. Osobně se domnívám, že do publikačních aktivit by abstrakty zařazovány být neměly. MUDr. Jan Diblík vypracoval svoji disertační práci v laboratoři a pod vedením Doc. MUDr. Milana Macka, CSc. Rád konstatuji hned na počátku posudku, že práci považuji za zdařilou a jejího autora, aniž bych ho osobně znal, považuji za příslib pro českou biomedicínsky orientovanou cytogenetiku.

Práce je poněkud atypicky členěna. Po souhrnu pokračuje obecný úvod, který stručným, ale přehledným způsobem prezentuje současný stav metodik FISH, PNA-FISH, PRINS, 3D-FISH a kvantitativní fluorescenční PCR. Výsledky získané posledně jmenovanou metodou nejsou diskutovány v první části disertační práce, ale jsou dokumentovány v příložené publikaci 2.1. Následuje přehled chromosomálních vad ovlivňujících plodnost a funkční topografie buněčného jádra. Po tomto úvodu následují 4 bloky, konkrétně chromosomální vady ve spermích, chromosomální vady v oocytech a chromosomální vady v embryích a jako epilog databáze klinických a výzkumných údajů. Poslední blok, vytvoření databáze, je opomenut v autoreferátu, ke škodě disertanta. Každý blok opět začíná úvodem a pokračují cíle, materiál a metody, výsledky a diskuse. Vzniká tak falešný dojem heterogenosti celé práce, který by mohl zmizet, kdyby se výsledky a diskuse všech bloků sjednotily. Formální zpracování je kvalitní, avšak s pokračujícími stránkami přibývá neopravených překlepů, což trochu kazí jinak velmi dobrou prezentaci.

Hlavním přínosem disertanta bylo zavedení sofistikovaných molekulárně cytogenetických metod a jejich dotvoření včetně odpovídajícího počítačového zpracování získaných dat. Že taková rozšíření metodického

potenciálu pracoviště mají i významné praktické aplikace netřeba zdůrazňovat. Zvláště bych také připomenul vytvoření databáze klinických a výzkumných údajů, jejíž poslední varianta má podle odborníků z mého oddělení profesionální charakter. Z výsledků, které mají charakter základního výzkumu bych vyzvedl zjištění abnormální periferní lokalizace chromosomu 18 v aneuploidních blastomerech. I když tento objev zatím přináší více otázek než odpovědí (jako např. chování chromosomu 18 v embryích s aneuploidii jiných chromosomů, než které byly dosud studovány) je zvolené téma vysoce aktuální a vztah umístění chromosomu v jádře k epigenetické regulaci exprese jeho genů představuje horkou topiku řešenou v současné době ve světě i na jiných modelech.

K disertantovi mám tři otázky obecnějšího rázu a několik formálních připomínek ke konkrétnímu textu.

1. V závěru části Chromosomální vady ve spermiích uvádíte, že získané výsledky neumožňují další hodnocení a stanovení referenčních hodnot. Co tedy budete se získanými daty dělat? Je možné je doplnit na 10 000 analyzovaných spermií na jedince, nebo sloučit vzorky z jedinců, kteří se od sebe neliší?

2. Frekvence trisomií 21 roste s věkem matky. Je tento přírůstek působen vzrůstajícím poškozením 2. meiotického dělení a následnou nondisjunkcí?

3. Byly dělány srovnávací studie frekvencí výskytu aneuploidií u jiných savců a pokud ano s jakými výsledky? Uvažujete o možnosti analyzovat jadernou topologii chromosomů na modelu embryí laboratorní myši s definovanou aneuploidií a s definovaným genetickým pozadím?

Připomínky k textu.

str. 9. V textu je odkaz na interfazické jádro na obr.2, ale tam jsou metafazické chromosomy.

str. 21. odst 3.4.4. V textu jediné věty jsou dvakrát zmíněny chromosomy 13,16,18,21 a 22 ale v prvním případě je nejasné v jakých aneuploidních buňkách vykazují periferní lokalizaci.

str. 22. odst 4.2.1. Primární spermatocyty jsou po celou dobu své existence (zygotene až diakinese a MI) tetraploidní (4N), tedy ne diploidní. Teprve sekundární spermatocyty jsou diploidní.

Překlepy

str. 28. - Vyšetřením chromosomů pouze chromosomů...

str. 34. 5.1.1. druhý odst. ... tvoří samičí (ne samčí) prvojádro
str. 34. 5.1.1. třetí odst. ...diktyotene
str. 37. Narishige, ne Narshige
str. 64. ...blastomery jsme rozdělili (ne rozdělily)
str. 64. ... Vzhledem k tomu, že jde... něco zřejmě vypadlo, text nedává smysl
str. 64. Defekty centrosomu (ne cntrosomu)
str. 64. mohl by tento poznatek ... k lepšímu...

Závěrem bych chtěl zdůraznit, že předložená práce představuje moderní přístup k molekulárně cytogenetické diagnostice aneuploidií v pohlavních a embryonálních buňkách a přináší originální poznatky o jaderné topologii aneuploidních chromosomů v blastomerách. Autor předložil nadprůměrnou disertaci dokládající zvládnutí nebývale široké škály metodik a schopnost autora k samostatné vědecké práci. Rád konstatuji, že disertační práce jednoznačně splňuje podmínky pro udělení titulu PhD a proto doporučuji, aby po úspěšné obhajobě byl tento titul MUDr. Janu Diblíkovi udělen.

V Praze, dne 8. září 2006

Doc. MUDr. Jiří Forejt, DrSc.
Oddělení savčí molekulární genetiky
ÚMG AV ČR