

Oponentský posudek

na diplomovou práci

Miroslavy Hančárové

Využitie Real-time PCR pri kvantitatívnej analýze voľnej fetálnej DNA v krvnom obehu matky

Předložená diplomová práce je obsáhlou studií, která se na 107 stranách zabývá analýzou plodové DNA v krevním oběhu matek. Přiložen je rukopis přijatý do impaktovaného periodika, jehož je kolegyně Hančárová spoluautorkou. Diplomová práce je velmi slušně zpracovaná po formální stránce, s minimem stylistických nedostatků a překlepů.

Anglikanismus chromozomální se mi zřejmě již nepodaří vymýtit, používá jej například i kolektiv renomovaných genetiků v českém překladu monografie Klinická genetika (2004).

V úvodu autorka vyzdvihuje bezrizikovost analýzy fetálních buněk a fetální DNA z krve matky v porovnání s tradičními, tzv. invazivními metodami prenatální diagnostiky jako jsou amniocentéza nebo odběr kfků amnia. Literární přehled je uveden analýzou jednotlivých invazivních metod a zajímavou kapitolkou o historii objevu plodových buněk a DNA v krvi matky. Následuje charakteristika různých typů fetálních buněk které se vyskytují v tělních tekutinách matky, stručně jsou probrány metody jejich izolace. Podobným způsobem je posléze pojednáno i o volné plodové DNA v krvi matky a genetických markerech které mohou být využity pro její detekci. Jádrem přehledu je kapitola o využití volné DNA a buněk plodu v prenatální diagnostice. Přehled literatury je doplněn stručnou charakteristikou těhotenských patologií se kterými autorka pracovala jakož i kapitolkou o fetální RNA v tělních tekutinách matky a jejím možném využití v prenatální diagnostice. Literární přehled je psán svěžím jazykem a je velmi čtivý. Jeho informační hodnota je poněkud snížena tím, že je autorka skoupá na citace použitých literárních pramenů.

Přes značný rozsah úvodních kapitol mám k této části jen dva dotazy:

- Na str. 39 se při výkladu preeklampsie používá bez upřesnění termín pozdní gestóza. Jedná se o synonymum preeklampsie?

- na str. 44 autorka uvádí že fetální RNA cirkulující v krevním oběhu matky je překvapivě stabilní, a to pravděpodobně díky asociaci s mateřskými partikulami. O jaké partikulě se konkrétně jedná?

Experimentální část práce je uvedena stručnou a precizní formulací výzkumných cílů. Obsáhlý a detailně zpracovaný oddíl je věnován použitému materiálu a metodám. Nejprve jsme zevrubně seznámeni s použitými chemikáliemi, kity, materiálem, přístroji a souborem vyšetřovaných žen. Následují postupy izolace DNA z plazmy a podrobný výklad o real-time PCR a různých způsobech stanovení množství vznikajících produktů. Výklad o real-time PCR by měl být dle mého názoru zařazen spíše do přehledu literatury. Orientaci v některých obrázcích by usnadnily vysvětlivky (konkrétně se jedná o obr. 8, 10, 15 a 16). Jádro metodické části je tvořeno popisem metodik real-time PCR použitých autorkou pro stanovení pohlaví, Rh faktoru plodu a pro kvantifikaci volné DNA v krvi matky. Metodická část je doplněna výčtem statistických metod a programů použitých pro vyhodnocení výsledků.

Výsledková část je vzhledem k velkému množství výsledků rozdělena do šesti oddílů. V prvních dvou je popsána závislost mezi množstvím volné fetální DNA v krvi matky a stupněm těhotenství. Následuje srovnání účinnosti různých způsobů izolace volné DNA z krve matky a porovnání spolehlivosti určení pohlaví plodu pomocí loků SRY a DYS 14 nacházejících se na chromozomu Y. Z dalších výsledků je patrné, že fetální DNA z krve matky lze s velkou mírou spolehlivosti použít i pro stanovení Rh faktoru plodu. Poslední ale velmi podstatná část výsledků se zabývá výskytem volné DNA v krvi matek s mnohočetným těhotenstvím a u různých typů patologických těhotenství. Komentář k odchylkám v obsahu DNA u těchto těhotenství je zajímavý, ale měl by být spíše součástí diskuse.

Z diskuse vyplývá především metodický přínos práce. Vybrané kity umožňují získat dostatečné množství DNA pro další analýzy, konkrétně stanovit pohlaví a Rh faktor plodu. Odchytky od závislosti mezi množstvím volné (fetální nebo celkové) DNA a stupněm těhotenství lze použít jako indikaci patologického průběhu těhotenství, které by mělo být dále testováno. Velmi významným aspektem práce je srovnání účinnosti různých způsobů izolace volné DNA z krve matky. Takové testování umožnilo porovnat nejen efektivitu různých metodik, ale i dosud roztrášené výsledky získané různými výzkumnými skupinami.

K diplomové práci je připojen rukopis, který se zabývá řešenou problematikou. Z příloženého dopisu vyplývá, že tento rukopis byl přijat do tisku redakcí časopisu *Fetal Diagnosis and Therapy*. Vzhledem k tomu že se rukopis zčásti překrývá s diplomovou prací a je dílem většího množství autorů, bych se rád ubezpečil o tom že všechny výsledky uvedené

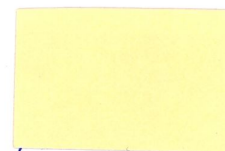
v diplomové práci byly získány skutečně jen diplomantkou (což je také otázka pro vedoucího diplomové práce).

ZÁVĚREČNÉ HODNOCENÍ

Rozsáhlá a dobře zpracovaná diplomová práce M. Hančárové dokumentuje pracovitost autorky a její zaujetí pro vědeckou práci. Diplomantka se dobře zorientovala v literatuře a osvojila si metody kvantitativní PCR, které využila pro analýzu volné DNA z krve matek. Získané výsledky mají praktický význam a proto vítám jejich publikování. Připomínky a dotazy jsou většinou formálního rázu a nesnižují vysokou kvalitu práce.

Diplomovou práci proto jednoznačně **doporučuji k obhajobě**

V Praze 10. května 2007



ŘNDr. Jiří Král, Dr.