

Posudek disertační práce

RNDr. Lucie Benešové

“Využití moderních molekulárně-biologických metod v prevenci, časné diagnóze, predikci léčby a prognóze nádorových chorob“

Předložená disertační práce se zabývá vysoce aktuálním vědeckým problémem, molekulární diagnostikou nádorových chorob. Citlivé a výkonné diagnostické metody, umožňující spolehlivé testování široké škály onemocnění v rozsáhlých vzorcích populace, jsou jedním ze základních předpokladů pro snížení nepříznivé bilance úmrtnosti v důsledku těchto onemocnění. Vyšetřování genetických markerů, jejichž detekci se tato práce zabývá, pak podává jedinečné informace pro stanovení preventivních opatření již v ranných stádiích, kdy se onemocnění ještě neprojevuje somaticky. Získané poznatky lze tedy využít nejen pro rozvoj diagnostiky, ale i prevence a léčby nádorových onemocnění. Jednotlivé kapitoly práce jsou zaměřeny na dokonalé porozumění molekulárnímu mechanismu vývoje chorob, volbu spolehlivých molekulárních markerů a vývoj analytické metodiky včetně výkonné instrumentace pro efektivní detekci mutací a polymorfismů v klinických vzorcích genomové DNA onkologických pacientů.

Po stránce formální je práce zpracována velmi dobře. Textová část je napsána přehledně a srozumitelně, kultivovanou češtinou. V části přehledné jsou etiologie, somatické projevy a molekulární mechanismy vzniku nádorů prezentovány také formou názorných obrázků, schémat a tabulek. Dosavadní výsledky vývoje studované oblasti jsou dokumentovány 162 citacemi z české i mezinárodní vědecké literatury. Experimentální výsledky jsou přehledně uvedeny v připojeném, úplném znění publikovaných prací.

Rovněž po stránce obsahové je práce kvalitně zpracována v obou částech. Každá z vlastních publikací je uvedena přehledným komentářem v češtině. Na základě výsledků souboru připojených vlastních prací je možné konstatovat, že cíle

práce, volně uvedené v jejím úvodu, byly splněny. Z hlediska vývoje analytických metod považují za nejvýznamnější přínos práce prověření dvou nově navržených experimentálních technik: separaci fragmentů DNA za cyklující teploty a dynamické fluorescenční značení pomocí interkalačních látek migrujících v protisměru k analyzovaným fragmentům DNA. Obě dvě techniky přináší nejen ekonomické úspory, ale i zvýšení spolehlivosti analýz. Za pozornost stojí i uvedené metody optimalizace analýz, návrh primerů pro PCR amplifikaci a výsledky analýz, které doplňují dosavadní molekulárně biologické znalosti v tomto oboru.

V práci se vyskytují některé drobné nepřesnosti. Na stranách 37, 39 a 42 se uvádí, že fluorescenční značení fragmentů DNA je nezbytné v případě jejich analýzy kapilární elektroforézou. Právě pro analýzy délkového polymorfismu restrikčních nebo amplifikovaných fragmentů DNA a heteroduplexní analýzy, popisovaných v kapitolách 3.4.3.2, 3.4.3.4 a 3.4.3.6, lze s výhodou použít levnějších přístrojů pro kapilární elektroforézu s absorbanční detekcí, které nevyžadují fluorescenční značení. Jak je ukázáno v mnoha studiích, jejich principiálně nižší citlivost je pro diagnostické účely dostatečná.

V souvislosti s názvy kapitol „3.4.3.2 Restrikční analýza“ a „3.4.3.4 Fragmentační analýza“, je nutné upozornit na skutečnost, že v literatuře jsou oba názvy zaměňovány. Dal bych tedy přednost názvům „Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů DNA“ (RFLP v anglické literatuře) a „Analýza délkového polymorfismu amplifikovaných fragmentů DNA“ (AFLP).

Větu: „Kapiláry jsou před každou analýzou plněny gelem rozpuštěným v elektroforetickém pufu.“ (str. 36) je třeba považovat za laboratorní žargon, bohužel nezdědka používaný i v seriózní technické literatuře. Z hlediska vývoje instrumentace pro kapilární elektroforézu fragmentů DNA považují za nutné upozornit na fakt, že teprve použití roztoků lineárních polymerů jako separačních medií ve stavu solu, bylo zásadní pro konstrukci vysoce výkonných, plně automatických, multikapilárních přístrojů. Separace ve fyzikálních i chemických gelech přináší zásadní problémy, které jsou překážkou jejich komerčního využití.

Závěr:

Předložená disertační práce jednoznačně dokazuje, že RNDr. Lucie Benešová použila adekvátní metody vědecké práce, ovládá teoretické principy studované problematiky, zvládla náročnou metodiku a instrumentaci molekulární diagnostiky a přinesla četné nové poznatky v tomto oboru. Disertační práce splňuje všechny stanovené podmínky, a proto doporučuji komisi pro obhajoby její přijetí.

Dotazy:

Mám na uchazečku dva dotazy, jejichž zodpovězení nijak neovlivní výše uvedené závěry.

- 1) Vymezte úlohu analýzy genetických markerů v systému molekulární diagnostiky nádorových onemocnění. Může spolehlivá a citlivá analýza proteinových markerů potenciálně vytěsnit metody genetické analýzy?

- 2) Porovnejte selektivity separace tří denaturačních elektroforetických metod: gradientové denaturační elektroforézy, elektroforézy v konstantních denaturačních podmínkách a Vámi navržené metodě elektroforézy při cyklující teplotě.

V Brně 25. května 2007



Ing. Karel Klepárník, CSc.
Ústav analytické chemie AVČR
Brno