

Oponentský posudek

na disertační práci MUDr. Jana Diblíka

„STUDIUM ANEUPLOIDIE V GAMETÁCH A EMBRYÍCH“

Předložená disertační práce se skládá z 83 stran textu, které shrnují poznatky v dané oblasti, metodiku, výsledky a diskuzi týkající se tématu disertační práce. Z tohoto hlediska je tento text samostatným pojednáním, ke kterému jsou přiloženy 3 práce v impaktovaných časopisech shrnující některé výsledky předchozího textu, jež se dosud podařilo publikovat, dále pak publikace v domácích časopisech, monografiích a sbornících, na kterých se disertant podílel. Následují abstrakta z konferencí.

Práce má 4 základní části:

chromozomální vady ve spermiích,
chromozomální vady v oocytech,
chromozomální vady v embryích,
databáze klinických a výzkumných údajů.

Chromozomální vady ve spermiích

První část disertační práce se zabývá chromozomálními vadami ve spermiích. Cílem bylo zdokonalení metody FISH a stanovení frekvence aneuploidií ve spermiích normospermiků a mužů s nízkou koncentrací spermií.

Navržený postup zpracování spermií před provedením fluorescenční in situ hybridizace (FISH) je velmi rozumný a řeší dva základní problémy vznikající zejména u patologických ejakulátů. Jde o nutnost vyčištění spermií od semenné plazmy a standardizaci dekonkondenzace. Je možno jednoznačně říci, že metodicky byla tato problematika zvládnuta. Využití 3D FISH u spermií bude, jak sám autor uvádí, omezeno jen na velmi speciální případy.

V druhé části této kapitoly autor vyšetřil frekvenci aneuploidií chromozomů 1, 18, 7, 8, X a Y u skupiny mužů s normospermií a oligospermií. Předpokládám, že základním cílem bylo zjistit, zda mezi těmito dvěma skupinami je rozdíl ve frekvenci aneuploidií ve spermiích. Je to pochopitelné, protože v literatuře byla popsána zvýšená frekvence aneuploidií ve spermiích u mužů s některými formami teratozoospermie, asthenozoospermie a oligoasthenoteratozoospermie. Obecně lze říci, že v disertační práci zjištěné frekvence aneuploidií jednotlivých autosomů se pohybují v rozsahu publikovaných výsledků a odpovídají i našim nálezům. Lze je tedy považovat za věrohodné. Problematické jsou, jak sám autor uvádí, frekvence dizomií pohlavních chromozomů a spermií XY, protože nebylo možno odlišit diploidní spermie. Tento problém je však velmi jednoduše řešitelný použitím třech sond, kdy kromě chromozomu X a Y se použije některý autozom. My rutinně používáme v tomto případě chromozom 8. Pokud je jeden signál autozomu, jedná se o dizomii, pokud jsou dva signály autozomu, jedná se o diploidii, takže lze rozlišit YY8, XX8, XY8, XX88, YY88 a XY88. Jako problém vidím, že u řady vzorků nebyly vyšetřeny dostatečné počty

spermií. Sám autor uvádí, že u normospermiků se běžně vyšetřuje 10 tisíc spermií. Je jasné, že tohoto počtu nelze dosáhnout u silných oligozoospermiků, avšak podle našich zkušeností, pokud je v ejakulátu alespoň 5 milionů spermií na mililitr, tohoto počtu lze dosáhnout. Z tabulky 2 vyplývá, že u řady vzorků, kde je dokonce koncentrace spermií kolem 50 mil/ml, bylo vyšetřeno jenom něco málo přes tisíc spermií. To má zřejmě za následek, že rozdíly mezi skupinou normospermiků a oligozoospermiků jsou velmi malé. Přesto bych předpokládal, že se autor pokusí o nějaké statistické zhodnocení a bude konstatovat, zda rozdíl zjistil, nebo ne. Velikost skupin (19 oligozoospermiků a 16 normospermiků), u kterých byl vyšetřen chromozom 1 a 18, bych považoval za dostatečnou pro statistické vyhodnocení. V závěrech však není žádné stanovisko.

Chromozomální vady v oocytech

Vyšetření pólových tělísek oocytů má řadu omezení, protože nemůže být analyzován paternální příspěvek do embrya. Jako přijatelná indikace je vyšetření aneuploidií, protože oocyt je významným zdrojem numerických aberací chromozomů v embryích. Tato část práce je v podstatě metodická a demonstruje zvládnutí odběru pólových tělísek a jejich vyšetření pomocí FISH. K metodice mám pouze jednu připomínku, a to k rozlišení prvního a druhého pólového tělíška. Na základě našich zkušeností považuji rozlišení pólových tělísek podle velikosti za více než nespolehlivé. Osobně se domnívám, že pokud proti tomu nejsou speciální důvody, je vhodné preferovat vyšetření blastomer embrya, které je mnohem spolehlivější. V každém případě však tato metoda musí být zvládnuta na pracovištích reprodukční medicíny jako metoda volby.

Chromozomální vady v embryích

Tato kapitola je klíčovou částí disertace, stejně tak jako je vyšetření blastomer embryí klíčovou diagnostickou metodou v rámci PGD. Po metodické stránce nelze mít k této části zásadní připomínky. V detailech se lišíme v některých názorech, což je dáno zkušeností každé laboratoře. Například bych preferoval fixaci HCl s Tweenem i u tří denních embryí a nepovažuji za nutné použít pepsin a paraformaldehyd. Je jistě přínosem této práce testování PNA sond, ale v praxi bych se stále bál použít jiné sondy než sety sond firmy Vysis pro vyšetření aneuploidií embryí. Pokud se týká výsledků, úspěšnost 91,5 % vyšetřených blastomer je přijatelná. V naší laboratoři, kde v průměru vyšetříme tisíc embryí ročně, jsme dosáhli maximálně kolem 95 %. Zjištěné frekvence abnormálních embryí a jednotlivých typů aberací odpovídají v zásadě našim nálezům a údajům z literatury. U disertační práce však nejde jenom o zavedení metod a jejich praktické využití, ale také o určitý vědecký přínos. Z tohoto hlediska se domnívám, že klíčové je v dané disertaci studium lokalizace chromozomů v jádrech preimplantačních embryí. Byla navržena vlastní precizní metoda měření a získány prioritní výsledky. Ty byly publikovány ve významných impaktovaných časopisech v dané oblasti a prošly tedy náročným recenzním řízením. Výsledky rozšiřují znalosti o lokalizaci chromozomů v jádrech interfázních buněk, které byly dosud studovány zejména v různých somatických buňkách dospělých jedinců nebo ve spermiích.

Databáze klinických a výzkumných údajů

Tato část je zaměřena na vypracování software pro databázi získaných údajů z předchozích studií a svědčí zejména o značné počítačové gramotnosti autora.

Pokud bych měl dr. Diblíkovi položit nějaký dotaz k jeho disertační práci, pak bych rád, kdyby se vyjádřil k problému, který trápí nás stejně tak jako určitě jeho, a to je problém chimérizmu chromozomálních aberací u ranných embryí ve vztahu k PGD.

Na závěr konstatuji, že disertační práce MUDr. Jana Diblíka splňuje všechny předpoklady pro její přijetí, a proto doporučuji, aby byl jmenovaný připuštěn k obhajobě disertační práce.

v Brně, dne 4.8.2006

Prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.