

Oponentský posudek na bakalářskou práci Markéty Stráské na téma „Výskyt polymorfismů v genu MTHFR a jejich možná asociace se sterilitou a problematikou opakovaných spontánních potratů v české republice“.

Markéta Stráská ve své práci obsáhle shrnula problematiku patofyziologie homocysteinu, úlohu MTHFR v metabolismu a podrobně se věnovala oblasti infertility a asistované reprodukce. Zmíněná témata popisuje^{že} podrobně, ale velice srozumitelně, je znát, že problematice opravdu rozumí a i po jazykové stránce je text v pořádku. Práce má standardní členění, velké množství citované literatury je uvedeno i odkazováno správně.

Zvláštností práce je fakt, že její důležitou součástí je dotazníkové šetření, vlastně hledání pacientů pro studii (je schválena etickou komisí ZSF JCU – proč to nebyla etická komise Přf JCU?).

Problémovým rysem práce je, že s nepodařilo shromáždit dostatečný počet infertilních párů, a cíle studie nemohly být naplněny (nehledě na rozsáhlou část věnované statistickému hodnocení, které v dané populaci 18 párů nemá smysl).

Velice oceňuji bohatou diskusi, kde studentka skvěle váží různé názory z popisované oblasti, polemizuje se zdroji i sama se sebou a nebojí se tzv. „střílet do vlastního hnízda“. Vše shrnuje ve stručném závěru.

K práci mám několik otázek a připomínek (prosím odpovězte jen na ty zvýrazněné):

- v práci se vyskytuje několik chyb a překlepů, ale např. česká republika s malým č v názvu diplomové práce je chybou zbytečnou
- v Úvodu (str. 1) jsem se pozastavil nad tvrzením, že samotná vysoká frekvence polymorfismů odůvodňuje předpokládat, že kombinovaný genotyp přinese „jistá znevýhodnění“
- na str. 2 je špatný vzorec (chybí síra)
homocysteinu – vlastně o něm je tato práce ?!
- nelíbí se mi webový zdroj obrázku na str. 8 – jedná se o ryze komerční, výrazně zavádějící stránku prodávající potravinové doplňky; ani ve stažených materiálech Dr. Neila Rawlinse jsem nenašel jediný odkaz na odb. literaturu
- na str. 10 není u popisu lokalizace genu MTHFR uvedeno raménko (p či q)
- str. 11 – polymorfismus nezpůsobuje záměnu C za T, on je tou záměnou
- str. 19: **Skutečně jsou ve studii osmnáctiletí muži a ženy, kteří jsou léčeni na neplodnost?**
- str. 19: **Píšete, že do studie byly zařazeny páry s idiopatickou neplodností bez potratu nebo s opakovanými potraty (2 a více). Proč byly vyřazeny páry s jedním potratem?**
- **Jak probíhal „nábor“? Na str. 20 píšete, že jste využila „sociálních sítí a diskusních portálů“ – jakých?**
- velkou pozornost věnujete designu studie, na str. 22 píšete, že byl pro internetovou součást dotazník upraven, bohužel v příloze je uveden jen jeden typ základního dotazníku
- na str. 24 používáte (alespoň myslím) chybně zkratku PK – v seznamu zkratk a dalším textu to znamená pozitivní kontrolu, zde Proteinkinázu K
- na str. 24 a 25 píšete, že TE pufr nebo voda byl přidáván k rozpuštění DNA podle požadované koncentrace – jak, když v tu chvíli nevíte, kolik DNA tam bude?
- trochu nečekaně máte v kapitole 4.1.4 Analýza dat uvedeny veškeré laboratorní postupy Vaší práce

- proč po PCR (před restrikcí) provádíte přečištění produktu? Při takto jednoduchém experimentu mi to není jasné (jedno PCR, jedno štěpení, výsledek by měl být jasný i bez přečištění)
- pozastavil jsem se nad hybridním (česko-anglickým) termínem „color kompenzace“
- na str. 30 uvádíte použití „Blanku“, je to totéž jako negativní kontrola v ostatním textu?
- velkou část (od str. 33) věnujete kontrolní skupině, z níž nakonec počítáte frekvence pro českou populaci. Zároveň uvádíte, že to jsou klienti diagnostické laboratoře, kteří si však „sami nechali vyšetřit“ polymorfismy MTHFR (str. 36). Jejich průměrný věk je 46 let. Jsou tyto pacienti opravdu reprezentativní vzorkem české populace? S jakou diagnózou se do laboratoře dostali?
- str.43: Do dotazníku byla zařazena otázka na aktuální užívání kyseliny listové – nemělo by spíš smysl ptát se na delší užívání v souvislosti se snahou o koncepci?
- na str. 44 jsou obrázky elfo gelu – zejména obrázek týkající se A1298C je dle mého názoru nekvalitní – odpovídá to skutečnosti nebo je to způsobeno nějakou změnou při vkládání do wordu? Jedná se zároveň o diagnostiku, kde byly chybně vyhodnoceny genotypy
- na str. 45 jsou uvedeny výsledky RealTime PCR. Píšete, že jedna z přítomných křivek značí užitou PK – škoda, že nepíšete, která křivka to je.
- na str. 45 jsou obrázky zlogaritmovaných křivek RealTime PCR, na str. 32 máte uvedené nákrety křivek z použitého kitu; navzájem se výrazně liší. V čem je rozdíl v jednotlivých zobrazeních?
- na str. 49 je graf korelačního vztahu, ale jsou tam jen vynesené hodnoty. Neměla by tam být proložená křivka nebo přímka?
- na str. 56 píšete o „nezdarech s financováním studie“ - o jaké nezdary se jednalo?
- v Diskusi mluvíte o „nešťastně“ volených otázkách a přípravě dotazníku. Kdo ho připravoval?
- v Diskusi se dozvídáme, že došlo ke špatnému zhodnocení genotypů, která pramenila jednak z rozdílné koncentrace PCR produktů, jednak z míchání vzorku a barviva před napipetováním do gelu, jednak nedostatečnou dobou separace na gelu? Proč jste nezměřili koncentraci DNA u PCR produktů, když jste měla k dispozici fluorometer Qubit? Proč jste míchala barvivo se vzorky po restrikci, když po PCR jste přidávala barvivo přímo do gelu? Proč jste neprodloužila čas elektroforézy?
- na str. 62 naznačujete, že Vy (v celé laboratoři) jste začali s posuzováním páru jako celku při léčbě neplodnosti a že se k Vašemu přístupu uchylují i v medicínské diagnostice. Ne, nezačali. Na str. 86 máte uvedeny dvě verze ilustračního letáku – dovolím si humorný komentář (nemusíte odpovídat): Jak dlouho jste přemýšleli nad změnou letáku pro etapu II, abyste ponechali úplně stejný text na úplně stejném místě s úplně stejnou velikostí i fontem a změnili pozadí tak, aby byl text hůř čitelný?
- v tabulce na str. 87 je uvedeno 38 vzorků, vyšetřeno bylo 18 párů. Kde se vzaly ty dva nadbytečné vzorky?

Práce Markéty Stráské má řadu nedostatků, spíše však organizačního charakteru. Studentka sama mě zaujala logickým uvažováním a skvělou formulací svých myšlenek. Práci doporučuji k obhajobě.



Ondřej Scheinost, 18. května 2018.



ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY
1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova
a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

128 00 Praha 2, Albertov 4
Tel.: 224 968 157, 224 968 141, Tel./Fax. 224 918 666
e-mail: apanc@LF1.CUNI.cz



POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomant/ka: **Markéta Stráská, Bc.**, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Téma diplomové práce: **Výskyt polymorfismů v genu MTHFR a jejich možná asociace se sterilitou a problematikou opakovaných spontánních potratů v české populaci**

Oponent: **MUDr. Aleš Panczak, CSc.**, Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze

Markéta Stráská se ve své práci zaměřila na testování dvou běžných polymorfismů genu *MTHFR* u párů s poruchou plodnosti a u jedinců z běžné české populace a jako zvláštní cíl si vytkla případný záchyt haplotypu, kde budou oba přítomny v pozici *cis*.

K oponentuře byla zaslána diplomová práce ve formátu pdf. Předložený spis o **92 stranách textu a 5 nečíslovaných stranách** (titulní, prohlášení, poděkování a obsah) je v českém jazyce. Musím, žel, konstatovat, že v předkládaném spisu se diplomantka nevyhnula některým formálním, obsahovým a stylistickým nedostatkům. Tyto jsou rozebrány dále (**Příloha 1**).

Diplomantka zvolila běžné členění práce – úvod, přehled písemnictví, metodologickou část, výsledky, diskuse, závěr.

Úvod (1 strana)

Přehled literatury (na 16 stranách) dostatečným způsobem zaznamenává současný stav poznání metabolismu (folátů a HCy) a poruch plodnosti; ke škodě je však nevyvážený – výklad o *MTHFR* má méně prostoru. Také chybí definice a výklad, co to je polymorfismus, což by se dalo podle názvu a zaměření práce očekávat; podobně by tam slušel obrázek molekuly enzymu *MTHFR* s vyznačením jednotlivých domén proteinu a něco více o (vzájemné) pozici obou polymorfismů. Stejně tak, už v úvodu mohl být výklad o možnostech (metodikách a strategiích) molekulárně genetické detekce polymorfismů *MTHFR* (který je pak až v metodologické sekci).

Metodologie (21 stran textu a obrazové dokumentace) je nepřípadně nazvána jako Design experimentů, ačkoli designována byla jen 1. skupina vyšetřovaných, a hlavně dokumentace k jejich získání včetně dotazníků na získání anamnestických dat. Použité laboratorní metody odpovídají experimentální kapitole; bylo použito více metod (odlišné pro obě skupiny subjektů): izolace DNA z bukalního stěru, PCR-RFLP, RT-PCR, reverzní hybridizace na stripu, sekvenace pak jako placená služba v jiné laboratoři. Jsou přiměřeně srozumitelně popsány, místy až příliš podrobně. (V textu pak na jiném místě je uvedeno, co dělala autorka vlastníma rukama a co „jen“ viděla.) Nábor subjektů a dotazníkové získávání odpovědí na klinické otázky je méně srozumitelně sepsáno.

Podkapitola 4.1.4 (a shodně 4.2.3) je autorkou nevhodně nazvána Analýza dat – vzhledem k tomu, co je jejím obsahem, považuji za výstižnější Molekulárně genetické vyšetřování (příp. analýza) polymorfismů *MTHFR* (ještě příp. - u účastníků studie/u jedinců z běžné populace). Podkapitola 4.1.5 o statistickém zpracování dat jen vyjmenovává metody, jejich užití není ostatně ani moc srozumitelné v sekci výsledkové a v diskusi. Málo pochopení mám pro pokračování této „statistické“ sekce, tj. 2. odstavec a tabulku XII na str. 33 – **pokud nebyla nějaká hodnota (obecně) nikdy publikována, nelze hodnotu definovat uměle!!** A proč je definována hodnota, zde aktivity enzymu, zrovna na 80 vs. 85 % pro genotypy CT/CC a TT/AC, není vysvětleno. Použití této (cituji) umělé definice a aplikace ve výsledcích a odhad rizika reprodukce jako procentuální ztráta aktivity enzymu nemají žádnou váhu.

Výsledky (celkem 16 stran) – text v řadě případů představuje verbální popis výsledkových tabulek (část je zalomena, zbylé jsou v oddílu Přílohy); autorka by si měla vybrat: buď text, nebo jen tabulka (a ta pak vždy přímo ve Výsledcích). Na několika místech chybí odkaz (pro snazší nalezení), kteráže tabulka v Příloze odpovídá konkrétnímu výsledku – chybí pro Tab. 10, 11, 14, 15 a 16. První 4 strany představují souhrn/přehled z dotazníkového šetření a jakkoliv jsou počty subjektů v 1. skupině malé, bylo vhodné v tabulkách (XVIII, XIX a XX) a obrázku 5.1 doplnit (kde to bylo možné) zastoupení v %.

V popisku k **obr. 5.2** jsou nepřesnosti; má být: 2. jamka zobrazuje **štěpený** fragment... a 3. jamka pak **neštěpený** fragment o délce **198 bp** a **štěpený** fragment o délce **175 bp**.

Graf na **Obr. 5.7** ukazuje **průměrná rizika páru** – jaký tohle má smysl?, jak velký je rozdíl v riziku 34 a 34,5, jak velký mezi 52 a 54,5 a jak velký v riziku 60 a 63,5. Tyto výsledky (pokud vůbec koncept celého „průměrného rizika“ v páru neopustit) a graf by potřebovaly prezentovat jinak, např. nějak páry a jejich četnost podle rizika seskupit do tří (do 30, střední 34 až 43 a vysoké nad 50) či čtyř (do 30, od 31 do 42, od 43 do 59 a nad 60) úrovní.

Korelační vztahy (str. 49) ani jinak, než neprůkazně nemohly (při tak malém počtu účastnících se párů) dopadnout; v grafu na obr. 5.8 by bylo vhodné zakreslit korelační křivku (přímku).

Pro **grafy** na obr. 5.4, 5.5, 5.6, a dále pak 5.11, 5.12 a 5.13 – autorka zvolila **nesprávný typ grafu** (součet % ve sloupci nemůže být více než 100 % a součet pro M a F ve všech 3 genotypových třídách nemůže být hodnota 200 %). V případě Grafu 5.6 by byl velmi vhodný tříosý formát grafu. V případě grafu na obr. 5.14 je formát použit lépe, a přesto je tato prezentace nic neříkající, nabízejí se jiné typy grafu, aby (citují) představa o rozdílnosti obou skupin (výzkumné a kontrolní) byla názornější.

Popis pod Obr. 5.9 je chybný nebo na obrázku zobrazované stripy byly špatně vybrány (strip č. 3 navíc budí podezření, že byl graficky manipulován). Strip 1. zobrazuje genotyp TT/AA (v popisu uvedeno CC/AA). Strip 3. zobrazuje genotyp TC/-- (v popisu uvedeno CC/TT; jenže i) takový genotyp neexistuje a ii) z alel polymorfismu A1298C není zobrazena ani jedna). Strip 6. zobrazuje genotyp TT/CC (v popisu uvedeno TT/AA).

Oddíl 5.3 **Porovnání výzkumné a kontrolní skupiny** – hodnoty jsou pouze tabelovány a autorka k tomu říká: „Z vypočítaných hodnot nejsou patrné žádné velké výkyvy v rozložení jednotlivých genotypů či alel ve výzkumné a kontrolní skupině, které by byly statisticky signifikantní na 95% hladině významnosti“. Jenže: není uvedeno jakým testem a jak a s jakým výsledkem testovali – **výkyv** není statistickým pojmem (má být rozdíl).

Podobně, v souvislosti s grafem na Obr. 5.14, **Kombinované genotypy MTHFR**, autorka hovoří o lepší představě o rozdílnosti obou skupin (studijní a kontrolní), avšak statistické zhodnocení rozdílů čtyř (!) skupin (ženy vs. muži a studijní vs. kontrolní skupina) opět chybí, takže graf vlastně neříká, zda nějaké rozdíly jsou či nejsou.

Konečně, **Grafy na Obr. 5.15 a komentář k nim jsou nesrozumitelné**, těžko interpretovatelné, mj. proto, že pořadí hodnot rizik na osách Y není přirozená číselná řada (riziko je spojitá veličina, že?), není jasné, jaký statistický test byl použit k porovnávání procentuálního (!) zastoupení v jednotlivých rizikových kategoriích a jaký byl výsledek, když (citují): „U žen je mezi oběma skupinami **okem patrný rozdíl** ($p > 0,05$)...“

Diskuse (na 10 stranách) se nepovedla, je stylisticky i odborně na nízké úrovni. Text prozrazuje buď nedostatek času či opravdovou bezradnost. Začátek (6.1) je pokračováním teoretické části či metodického výkladu – sebehodnocení a sebekritika (citují str. 56 dole) ohledně dotazníkového sběru dat by snad mohla být součástí diskuse, kdyby autorka v experimentální části porovnávala dvě skupiny se dvěma typy dotazníků. Jestli nový možný koncept dotazníku bude přehlednější a logičtější, nelze ověřit (nebylo v práci ověřováno), a proto je asi nad rámec toto diskutovat. Autorka dále komentuje některé „technologické“ těžkosti genotypizace a dále pak cituje práce za posledních 20 let, které jsou ve prospěch a proti existenci *cis* konstituce obou polymorfismů. Cituje i další aspekty, ale vlastní výsledky vlastně nesrovnává. Dále si stěžuje, že o referenční skupině nebyly získány žádné detailnější informace – ale vždyť s předpokladem, že se jedná o zdravé jedince (s nejspíše bezproblémovou reprodukční anamnézou), do studie tyto osoby použila.

V druhé části diskuse (6.2) je uvedena informace, která měla být už v Metodice, totiž, že kontrolní (náhodná) populační skupina musela být umenšena o příbuzné osoby. Dále překvapí výrokem: „Do dnešního dne neexistují žádné oficiální studie zkoumající četnosti polymorfismů MTHFR pro českou populaci, tudíž nebylo možné závěry této části práce konfrontovat s jinou studií.“ Sama autorka cituje celkem 3 zdroje (2 bakalářské a diplomová práce), které se zabývají českou populací, a mohla se tedy

aspoň pokusit spočítat genotypové a alelické frekvence a porovnat se svými nálezy (viz improvizovaná tabulka, **Příloha 2**).

Autorka cituje především zahraniční autory, jak k patologiím reprodukce, tak i kardiovaskulárním; správně zmiňuje, že se upustilo od testování polymorfismů MTHFR v souvislosti s tzv. trombofilií. A možná, že se výsledky diplomové práce v tomto jediném polymorfismu číselně (procentuálně) shodují s frekvencemi zaznamenanými v Maďarsku, ale „genetické složení“ Maďarů je opravdu jiné než to v české populaci!

Závěr (1 strana) shrnuje metodické možnosti a výsledky práce. Je velmi pravděpodobné, že zastoupení kombinovaných genotypů, jak je publikuje tato magisterská práce, se stanou jedním ze standardů, ke kterým se budou odkazovat následovníci.

Literatura (kapitola 8., celkem 84 položek) pokrývá léta 1932 (!) (biochemie homocystinu) až 2017, se dvěma (nenáhodnými!) maximy 2007-2017 a 1998 až 2000.

Seznam použitých zkratk není úplný: chybí vysvětlení např. FAM, HEX, BCIP/NTB, DNAT.

Přílohy: především tabulky **zdařilé, přehledné**. Bylo by zajímavé graficky znázornit data v Příloze 7 – i velká variabilita v koncentracích DNA může mít normální rozložení. V příloze 8 a 9 mohly být namísto zkratk v levém krajním sloupci celé názvy řádků (a jiné informace) – místa se zdá být dostatečně – bylo by informativnější. (Chybí seznam příloh.)

Dotazy k obhajobě:

- 1) Molekulární genetika: Je zřejmé, že práce je výsledkem týmové spolupráce, nicméně, můj první dotaz směřuje na **konkrétní podíl diplomantky při plánování a realizaci výzkumné a diagnostické práce v DNA laboratoři**.
- 2) Formální genetika: vyšetření jedinci jsou buď tzv. heterozygoté nebo homozygoté. **Jak byste formálně geneticky pojmenovala genotypy TT/AA a CT/AC a jaké mohou být genotypy potomstva?**
- 3) Epidemiologie: Navrhněte, **jak by bylo možno se pokusit stanovit metodami *in silico*, zda ty tři chybějící (a diskutované) komplexní (*cis*) genotypy existují.**
- 4) Statistické zpracování: Co znamená pro strukturu souboru, když medián se nerovná průměru (zde: 49 let vs. 46 let)?
- 5) Experimentální uspořádání: **Je nějaká možnost analyzovat vazebnou konfiguraci (fázi) metodami klinické genetiky?**

Závěr a doporučení:

Problematika reprodukčního zdraví a hledání jeho prediktorů (např. molekulárně genetických), podobně jako snahy lépe poznat strukturu normální české populace ohledně těchto vyšetřovaných markerů je společensky i výzkumně významná. Snahy posunout toto téma dále je třeba ocenit.

Diplomová práce Markéty Stránské na téma polymorfismů MTHFR a jejich možných asociací s poruchami plodnosti však dle mého názoru potřebuje kritickou redakci a revizi a v současné podobě je její obhajoba problematická.

Je milé s jako odvahou do studie se subjekty s narušenou reprodukční anamnézou studentka šla – musela si být vědoma, že při tak malém konečném rozsahu vzorku a tak nízkém (předpokládaném) zastoupení *cis* konfigurací byla šance na úspěch (jejich záchyt) téměř nulová.

Pokud při obhajobě uchazečka bude svoji práci adekvátně prezentovat a v diskuzi přesvědčí o svých znalostech, pak bude možno přijmout i tuto práci jako podklad k obhajobě a udělení magisterského titulu.

V Praze 19. května 2018



MUDr. Aleš Panczak, CSc.
Ústav biologie a lékařské genetiky
1. lékařské fakulty UK a VFN
128 00 Praha 2, Albertov 4
Tel.: 224 96 81 57, 224 96 71 72
e-mail: apanc@lf1.cuni.cz

Příloha 1

V práci je málo překlepů, neubráníla se však 3 hrubým chybám (shoda podnětu s přísudkem – str. 20, 3. ř. zdola má být: ...zájemci vyplnili..., na str. 26, 2. odst. po rozmražení..., na str. 28, 8. ř. zdola K přečištěným...) a řadě stylistických neobratností a také neologismům (lidská ztrátovost plodů; protestování).

S odbornou terminologií místy nakládá nepřesně (IUGR x SGA; opakovaně: neprůchodnost vaječníků – má být vejcovodů; restrikce vs. restrikční štěpení).

Se současnou podobou jazyka, místy strojenou a v předlouhých větách, nekoresponduje např. důsledně autorkou používaná tradicionalistická forma *methyl*. Nadužívá pojem izolát DNA i na místech, kde jde o vzorek DNA konkrétní osoby. Opakovaně se v textu vyskytují anglicismy: např. je/jsou *k nalezení* v tabulce, namísto českého jsou uvedeny v tabulce (str. 34). Opakovaně: je lépe používat: v práci **se uvádí** (než udává se), podobně dva **uvedené/uváděné** objemy. Nesprávně (např. str. 15, str. 19) používá **nadále** – v ČJ má jiný význam, než v AJ; lépe je **dále**.

Vybrané chyby či nepřesnosti (formulace, terminologie, pravopis, typografie):

Hned na str. ii: prevalence vs. frekvence, anotace v AJ vyžaduje pečlivější překlad, uvozující věta posledního odstavce je vložena 2x.

Str. iii: poskytnutí pacientů

Str. 1: problematika, lépe jedn. č.; lidská ztrátovost plodů; filosofuje; z čeho dovozuje, že kombinovaný genotyp dvou velmi frekventních polymorfismů může přinášet znevýhodnění.

Str. 3: popis k obr. 2.2: MTTR, má být MTR

Str. 5: popis k obr. 2.3: lépe Metabolismus homocysteinu (vlastní zpracování) – v posl. větě je to matoucí, mění to její vyznění. Srovnej Obr. 2.2 Schéma metabolismu homocysteinu (dle Pokorný a Minárik, 2013).

Str. 7, 2. ř. zdola: k dostání

Str. 8: angl. *body* má ještě jiný překlad, totiž **organismus** – v obr. 2.5 by byl vhodnější než tělo.

Str. 9, ř. 4 shora, správně má být: ...její vliv **na** různé defekty, například **na** *spina bifida*.

Str. 10, 1. ř.: ... zvýšeným **ukládáním** HCy v plazmě označujeme jako hyperhomocysteinémií – má být zvýšenou koncentrací, příp. hladinami

Str. 10, nadpis Tab. 1: ... hyperhomocysteinémie

Str. 10, 7. ř. zdola, má být: ...v oblasti p36.22

Str. 11, uprostřed: ...pracuje tento enzym u variantního homozygota 677TT pouze z 30 %... Lépe: ...je aktivita pouze 30% (třicetiprocentní)

Str. 12, ř. 13 shora: ... je možné **považovat za ukazatele...**

Str. 13, 4-5 ř.: vágní, nesrozumitelné vyjádření

Str. 14, odstavec 2.3.2, vhodnější název: **Rizikové faktory pro vznik sterility** (příp. neplodnosti). A také by na jeho začátku měly být známé faktory vyjmenovány; věk je jenom jeden z nich!

Str. 15, ř. 3, lépe: Dalšími příčinami mohou být předčasné ovariální selhání a dysfunkce štítné žlázy...

Str. 16, 1. ř. zdola: ...ukončením těhotenství...

Str. 24, 1. ř. shora, lépe: Ve zkratce: odběr bylo třeba provést nejlépe....

Str. 24, 1. ř. zdola: Aqua pro Injectione (ještě jednou na str. 28, 10. ř. zdola)

Str. 25, 3. ř. zdola, má být: ...pomocí dvojice primerů, po jejímž skončení dojde k **restrikčnímu štěpení** namnožených amplikonů za použití restrikčních endonukleáz.

Str. 26, tab. V, střední sloupec lépe: Délka PCR produktu

Str. 26, 2. odst.: ... po rozmražení...

tamtéž: ...přidány **2 µl** DNA...

Str. 27, tab. VII a VIII, a na více místech v práci (2x na str. 28 dole), je třeba rozlišovat: protein MTHFR, gen *MTHFR* (*kurzívou, italica*)

Str. 27, 9. ř. zdola: barvičky

Str. 30, popis k Obr. 4.2: doporučuji důsledně používat spojení genotyp CC, příp. homozygot CC, atd. ve všech závorkách

Str. 30, posl. odstavec, název lépe: Barevná kompenzace či kalibrace (nebo Kompenzace barev)

Str. 31, 7. ř. shora, lépe: ...centrifugovány při 10 tis. otáčkách po dobu cca 15 sekund ... (zkratka pro sekundu je s, nikoliv sek)

Str. 32, 1. odst., název: **VYHODNOCOVÁNÍ**

tamtéž: FAM kanál (530 nm) a HEX kanál (560 nm) – není vysvětleno, co to znamená. Popisek pod obr. 4.3 prakticky opakuje text nad obrázkem
 Str. 35, uprostřed: byla přendána – lépe snad přenesena
 Str. 35, 5. ř. zdola: ...temperovaného...
 Str. 36, 3. ř. zdola: ...mikrozkumavky...
 Str. 37, tab. XIV, 2. ř. tab.: koncentrace polymerázy by měla být hned v 1. sloupci
 Str. 58, 1. ř. shora, má být: ...přijaly...
 Str. 61, 1. ř. zdola, má být: ...je logické, že se snahy o početí staly...
 Str. 64, 3. ř. shora, má být: ...vyřadit příbuzné...

Příloha 2

Frekvence C677T	Slezáková	Vavrušková	Zapletal	Stráská	
n =	106	300	828	114	36
CC	0,387	0,46	0,40	0,439	0,361
CT	0,472	0,43	0,48	0,465	0,556
TT	0,141	0,11	0,13	0,096	0,083
C	0,623	0,675	0,635	0,6875	0,6388
T	0,377	0,325	0,365	0,3285	0,3611