

Studentka: Bc. Markéta Stráská

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

Posudek školitele

Práce Markéty Stráské se zabývá souvislostí mezi výskytem konkrétních polymorfismů v genu *MTHFR* u jedinců trpících idiopatickou sterilitou nebo opakovanými spontánními potraty. Tato práce navazuje na její bakalářskou práci, ve které se věnovala vlivu polymorfismů enzymu *MTHFR* a trombofilních mutací na průběh gravidity.

Práce je logicky rozčleněna do kapitol a podkapitol, je psána srozumitelně, čtivě a velice podrobně popisuje design celého experimentu. Jedná se o 90 stran textu, takže určitě došlo k přehlédnutí některých překlepů, bez kterých se dle mého názoru neobejde asi žádná obsáhlejší práce. Po gramatické, stylistické i grafické stránce hodnotím práci jako nadprůměrnou. Oceňuji zejména rozsáhlou a podrobnou diskusi, ve které jsou diskutovány výsledky recentních i starších studií, které přináší pro daný výzkum stejně významné informace a dále její samostatnost při sepisování práce.

Hlavní hypotézou, ze které vychází tato práce je předpoklad, že opakované spontánní potraty mohou být způsobeny různými kombinacemi polymorfismů C677T a A1298C v *MTHFR* genu u obou rodičů a následně je pak ovlivněna i životaschopnost jejich plodů, které nesou nepříznivou kombinaci (*cis*) v genu *MTHFR*. Současné studie ukazují, že jedinci s genomovou konstitucí *MTHFR* 677TT/1298CC, *MTHFR* 677TT/1298AC nebo *MTHFR* 677CT/1298CC (všechny z nich jsou známy jako *cis* konfigurace) se ve studovaných skupinách nevyskytují nebo se vyskytují velice omezeně. Zmíněné polymorfismy zásadně oslabují aktivitu enzymu *MTHFR* a tím i metabolismus folátu, který je zásadní pro syntézu nukleových kyselin a methylační procesy, stejně jako pro regulaci buněčné exprese. Dramatický dopad výskytu alely *MTHFR* 677T na úspěšnou graviditu u chromozomálně normálních embryí doporučených k implantaci byl již vědecky prokázán. Navíc genotypy v *cis* konfiguraci vykazují v normální populaci velmi nízkou četnost a byly ve zvýšené frekvenci pozorovány ve skupině vzorků plodových tkání získaných ze spontánních potratů. Práce tedy vychází z vědecky podložených faktů.

Hlavním cílem experimentální části bylo otestování párů s poruchou plodnosti nebo u nich dochází k opakovaným spontánním potratům a to v souvislosti s *cis/trans* konfigurací dvou nejběžnějších polymorfismů v genu *MTHFR* (studovaná skupina). Dalším cílem bylo statistické zhodnocení frekvence vybraných polymorfismů C677T a A1298C v genu *MTHFR* v české populaci na základě dat získaných v naší genetické laboratoři (kontrolní skupina). Oba hlavní cíle i jednotlivé dílčí cíle byly naplněny, ačkoli velikost studované skupiny nebyla dostatečná pro statistické zpracování. Přesto byla získaná data z obou skupin statisticky zpracována. Všechny získané výsledky jsou v práci poměrně podrobně uvedeny v tabulkách či grafech.

Finanční prostředky pro výzkum jsme se pokusili získat na dvou frontách. Návrh projektu soutěžil ve veřejné soutěži vyhlášené Grantovou agenturou ČR, kde neobstál a pak studentka podala návrh projektu také v rámci fakultní soutěže SGA. Hodnocení SGA dopadlo velice dobře (projekt byl hodnocen velice kladně, stupněm A ve všech kategoriích), ale bohužel byl vyřazen z technických důvodů, kdy chyběl fakultní garant a já jako vedoucí práce jsem v té době nebyla zaměstnancem fakulty a tedy můj student v roce 2016 nemohl žádat o finanční prostředky v této soutěži. Na základě této zkušenosti byla pravidla soutěže pozměněna a žádat mohou i studenti, které vede externí školitel.

Soubor vzorků pacientů s idiopatickou neplodností či s opakovanými spontánními potraty nebylo jednoduché nashromáždit. Pro užší spolupráci jsme oslovili reprodukční centrum IVF centrum prof. Zecha v Plzni a některé gynekology. Bohužel jsme zjistili, že v těchto zařízeních je párů s opravdu idiopatickou neplodností velice málo. Nakonec Markéta oslovila veřejnost a výběr kandidátů pro projekt byl proveden na základě vyplnění vstupního on-line dotazníku.

Důležitou součástí projektu byla formulace výzkumných otázek uvedených v cíleném dotazníku, na základě kterého byli vybráni účastníci studie. K formulaci otázek uvedených v dotazníku jsme přizvali specialisty z reprodukčního centra a to Mgr. Martinu Hrubou, Ph.D. a MUDr. Renátu Krmíčkovou, Ph.D. Projekt byl schválen etickou komisí ZSF JU, protože Přírodovědecká fakulta takovou komisí nedisponuje.

Studentka pracovala po celou dobu velice samostatně a sama si zorganizovala hledání zájemců o genetické vyšetření ve dvou vlnách. Vzhledem k tomu, že náklady na projekt financovala laboratoř, nebylo by možné zpracovat stovky vzorků, jak bylo původně plánováno v návrhu projektu pro GA ČR. Nedostatek získaných vzorků do studijní skupiny tedy není chybou studentky, ale je to praktický důsledek nezdařilých pokusů o získání finančních prostředků z externích zdrojů. Její projekt měl posloužit jako pilotní projekt, který by ukázal, zda je naše hypotéza správná.

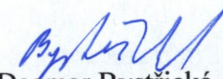
Během studia získala studentka kvalitní laboratorní praxi v akreditované genetické laboratoři, naučila izolaci DNA z periferní krve i z bukových stěrů, prakticky si osvojila několik diagnostických přístupů: PCR RFLP, PCR ARMS, reverzní hybridizaci na stripech, real-time PCR, gelovou elektroforézu, analýzu získaných dat. Veškeré použité postupy v uvedené v práci probíhaly dle vypracovaných zavedených postupů, které laboratoř běžně používá. Práce s DNA, která je izolována z bukových stěrů, je problematičtější než práce s DNA získané z periferní krve. V případě nejasností při odečítání výsledků bylo přistoupeno k doplnění o další metodu a to o sekvenování PCR produktů. Pokud budu hodnotit její schopnost pracovat v laboratoři, tak mohu konstatovat, že patří k těm šikovným navíc se schopností samostatně uvažovat. Poměrně rychle zvládla laboratorní praxi ve zdravotnické laboratoři.

Statistické hodnocení výsledků je provedeno na vysoké úrovni. Ke spolupráci byl přizván profesionální statistik. Bohužel vzhledem k malému počtu analyzovaných vzorků vyšla data většinou neprůkazně. Přesto se podařilo prokázat absenci *cis* genotypů ve sledované kontrolní i studijní skupině, kdy bylo celkem vyšetřeno 152 jedinců. Zajímavý byl zjištěný nízký výskyt původního genotypu (pokud je tento genotyp vůbec původní) *MTHFR* 677CC/1298AA v obou skupinách.

Závěrem chci dodat, že odborná stránka diplomové práce byla zajištěna ve všech oblastech a pevně věřím, že pokud by měla Markéta zpracovat větší objem vzorků v rámci řešení grantu, nebyl by to pro ni problém a snad by získala i zajímavější výsledky podporující původní hypotézu. Vymezené cíle diplomové práce byly naplněny. Sepsání této práce bylo i přes malý počet vzorků ve studijní skupině jistě velice náročné. Spolupráce se studentkou byla velmi příjemná, k řešení dílčích navíc velice oceňuji její nadšení pro dané téma, protože gen *MTHFR* a jeho význam je v českých kruzích bohužel spíše ignorován, ačkoli za hranicemi se mu odborné publikace věnují nejen v souvislosti se sterilitou a opakovanými spontánními potraty.

Práci doporučuji k obhajobě.

Dne 23. 5. 2018 v Adamově


Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.