

OPONENTSKÝ POSUDEK  
kandidátské disertační práce

Doktorand: *MUDr. Hana Šafránková*

Téma disertační práce:

*Genetický podklad vybraných chronických nefropatií*

*Biomedicína; Fyziologie a patofyziologie člověka*

Předložené písemné podklady pro obhajobu disertační práce MUDr. Hany Šafránkové (Obeidové) poskytují ucelený přehled o řešené problematice.

Disertační práce je členěna podle běžných zvyklostí na abstrakt (český a anglický text), seznam zkratk, úvod a literární přehled, cíle disertační práce, metodiku (údaje o pacientech a popis analýzy DNA), výsledky, diskuze a závěr. 114 citací literatury svědčí o dobrém přehledu sledované problematiky.

Za seznamem literatury následuje seznam 11ti publikací, na kterých se doktorandka podílela. 5 z těchto publikací je podkladem disertační práce a jsou včleněny do disertační práce formou přílohy v plném rozsahu. Doktorandka je první autorkou tří z pěti publikací, které jsou základem disertační práce. Publikace představují výsledky výzkumu z let 2006 a 2010-2012.

*Jelikož publikace, které jsou podstatnou součástí disertační práce, jsou výsledkem týmové spolupráce, ráda bych se zeptala na konkrétní podíl doktorandky při plánování a realizaci experimentů.*

## Text

### Zkratky

*Česká nomenklatura chemického názvosloví:*

serin-threoninkinasa – **ne** serin-threonin kináza

Obdobné chyby se vyskytují i v dalších oblastech textu.

### Vysvětlivky zkratk:

**většina** zkratk je vysvětlena pouze **českým překladem** (i když to neodpovídá písmenům zkratk), ale **několik z nich je popsáno pouze anglicky – proč?**

### Úvod a literární přehled

Úvod rozsahem a počtem citací odpovídá požadavkům kladeným na disertační práci. Oceňuji začlenění obrázků a přehledné tabulky se seznamem vybraných genů asociovaných s nefrotickým syndromem.

Na **str. 15** v kapitole 1.2.1.2. by měl být zmíněn celkový vztah rodiny genů Bcl-2 k apoptóze; ne pouze zmínka o genu *Bad*.

**Str. 25**, první odstavec - je uveden **chybně princip působení přípravku bevacizumab**.

### Cíle disertace

Cíl disertační práce je jednoznačně definovaný– (i) objasnění genetické příčiny nejčastějších forem nefrotického syndromu v ČR u dospělých pacientů a (ii) sledování vlivu vybraných polymorfismů genů *NPHS2* a *VEGF* na průběh tří typů glomeruronefritid (FSGS/MCD, MGN, IGAN).

## Metodika

### Pacienti

Pro genetickou analýzu *NPHS2* genu bylo zařazeno 71 pacientů s FSGS/MCD (fokální segmentální glomeruloskleróza / nemoc minimálních změn), 169 pacientů s IGA nefropatií a 46 s potvrzenou membranózní nefropatií. Kontrolní skupina se skládala z 300 dobrovolníků. Byl zohledněn jejich věk a pohlaví. U skupiny FSGS/MCD bylo další členění na odezvu při léčbě kortikosteroidy.

U 71 pacientů s FSGS/MCD byl průměrný věk nástupu onemocnění  $33,2 \pm 18,6$  let. U 10ti pacientů byl nástup již v dětství; u 4 z nich byla pozitivní rodinná anamnéza. Cituji: „Jedná se pravděpodobně o AD typ dědičnosti.“ **Co Vás vedlo k tomuto závěru?**

Vyšetření polymorfismu promotoru genu *VEGF* bylo provedeno na skupině 213 pacientů - FSGS/MCD (56 pacientů), IGA nefropatie (113 pacientů), MGN (44 pacientů). Kontrolní skupina se skládala z 311 dobrovolníků.

**Na tomto místě bych se ráda zeptala, proč byly zvoleny dvě odlišné skupiny jedinců pro analýzu genů *NPHS2* a *VEGF*?**

### Vyšetření na úrovni DNA

Analýza DNA byla provedena na vysoké profesionální úrovni i se zařazením relativně nové metody HRM (high resolution melting).

Pro mutační analýzu genu *NPHS2* byla využita PCR metoda všech 8mi exonů s následnou přímou sekvenací. U některých pacientů byla použita metoda HRM.

Při stanovení polymorfismu v 5. exonu genu *NPHS2* (polymorfismus p.R229Q) byla provedena restriční analýza. Metodou HRM byl stanovován polymorfismus v 1. exonu (p.P20L).

Ve dvou oblastech promotoru genu *VEGF* byl sledován polymorfismus. V promotoru byla nalezena inserce (adice) 18ti **nukleotidů** (ne bází jak je chybně uvedeno v textu str. 38) na pozici -2549, což představuje přítomnost delší alely *A* (-2578). Kratší sekvence je asociována s přítomností alely *C*.

Polymorfismus na pozici -1154 představuje přítomnost dvou možných variant alel - alely G/A.

**Je známá sekvence insertovaných nukleotidů? Jde vždy o shodnou sekvenci nukleotidů pokud je u jedince přítomna „delší“ alela *A*?**

**Záznam rozdílu v sekvenci mezi alelami *A* a *G* jsem nenašla ani v textu práce ani v příloze *in extenso*. Jak se liší alela *A* a *G* v pozici -1154 ?**

**Na str. 46 text týkající se polymorfismu -1154 VEGF se zdá být zmatený; jsou to překlepy?**

## Výsledky

Shrnutí výsledků řešené problematiky i začleněné publikace *in extenso*, dokládají **splnění cílů práce.**

### **Autoreferát**

Předložený autoreferát přehledným způsobem shrnuje studovanou problematiku. Obecné aspekty jsou doloženy seznamem literatury, která se konkrétně vztahuje k předkládané disertační práci. Cíle a závěry výzkumu jsou jasně definovány.

### **Dotazy**

**a) Vyjádřete se, prosím, k v textu se vyskytujícím pojmům: mutace, patogenní mutace, polymorfismus u vybraných genů v souvislosti s chronickými nefropatiemi. Jaký přínos má/bude mít genetická analýza pro jejich léčbu?**

**b) Které další geny předpokládáte, by mohly být klíčové pro poskytnutí další informace o genetickém podkladu chronických nefropatií?**

**c) Jakou informaci by vám mohla poskytnout mutační analýza zvolených genů z biopsie versus periferní krve pacienta?**

**d) Zvažujete u všech pacientů rutinní genetické vyšetření před léčbou? Jak by byl takový přístup časově a finančně náročný?**

### **Závěr:**

Disertační práce *MUDr. Hany Šafránkové - Genetický podklad vybraných chronických nefropatií* se vyznačuje tvůrčím přístupem k řešení problematiky.


Soubor pacientů s chronickou nefropatií a kontrol (dobrovolníků) byl vyšetřen na přítomnost mutací (8 exonů) a polymorfismů v genu *NPHS2* kódujícím podocin a také v promotoru genu *VEGF*. Molekulárně genetická analýza zvolených genů směřovala mimo jiné ke stanovení, zda je účelné zavést mutační analýzu jako rutinní vyšetření. Z výsledků studie vyplynulo, že mutační analýza genu *NPHS2* by měla být provedena u všech dětských pacientů se steroid-resistantním nefrotickým syndromem a při nálezů mutace by mělo být zváženo ukončení imunosupresivní terapie. Mutační analýza by měla být prováděna i u pacientů před transplantací ledvin.

Polymorfismus p.R229Q a i.p.P20L genu *NPHS2* se nezdá být příčinou vzniku nefrotického syndromu.

Vztah genu *VEGF*, respektive 2 polymorfismů v jeho promotoru, neukázal na zásadní souvislost s chronickými nefropatiemi.

Klinická i laboratorní erudice, literární rozhled, originalnost nálezů a presentace výsledků v odborných časopisech splňují podmínku, aby disertační práce byla přijata k obhajobě. V případě kladného výsledku obhajoby předložená práce splňuje podmínky pro udělení vědeckého titulu PhD.

V Praze 19. 8. 2013

  
Doc. RNDr. Berta Otová, CSc  
Ústav biologie a lékařské genetiky  
Universita Karlova v Praze, 1. LF a VFN