

Katedra antropologie a genetiky člověka, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
Oponentský posudek na diplomovou práci

ASOCIACE VYBRANÝCH POLYMORFISMŮ GENŮ OXIDATIVNÍHO STRESU S DIABETES MELLITUS 1. A 2. TYPU

Autor: Bc. Lucie Kloboučková

Školitel: Ing. Anna Kotrbová-Kozak, Ph.D.

Oponent: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Předkládaná diplomová práce vypracovaná pod vedením Ing. Anny Kotrbové-Kozak v laboratořích Ústavu obecné biologie a genetiky 3. LF UK je asociačním typem studie a zaměřuje se na odhalení genetických rizikových faktorů zapříčiňujících nedostatečnou odpověď organismu na oxidativní stres a to s ohledem na rozvoj obou hlavních typů diabetu, T1DM a T2DM.

Cílem studie bylo provedení genotypizace vybraných polymorfismů genů *GSMT1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *SOD1*, *SOD2*, *GPXI* A *CAT* za pomoci několika metod (PCR-RFLP, TaqMan® Genotyping, multiplex PCR) u souboru pacientů T1DM, T2DM a nediabietických kontrol, analýza frekvencí jednotlivých alel mezi sledovanými skupinami a odhalení možných vztahů a asociací. Jako druhý cíl si práce klade stanovení hladin malondialdehydu, produktu lipidové peroxidace, v plazmě vyšetřovaných osob, zhodnocení míry jeho tvorby s ohledem na diagnózu a zejména pak analýzu závislosti produkce malondialdehydu na studovaných variantách genů oxidativního stresu.

Diplomová práce o rozsahu 86 stran je členěna do 8 hlavních kapitol včetně seznamu citovaných literárních pramenů a seznamu zkratk. Vybrané výsledky jsou zde prezentovány formou 26 obrázků a 23 tabulek. Struktura a členění práce jsou standardní a odpovídají požadavkům. Co se jazykové úrovně týče, práce je psána čtivě a srozumitelně (zejména teoretický přehled a kapitola Materiál a Metody), téměř bez překlepů či jiných jazykových prohřešků. V práci je správným způsobem citováno 118 literárních pramenů či internetových odkazů, z toho přibližně 15 % tvoří odkazy na knihy, skripta či učebnice. Diplomová práce je bez závažných formálních nedostatků. Poněkud matoucí je užívání dvojího způsobu zápisu desetinného čísla, jak v podobě desetinné čárky, tak v podobě tečky. Grafy na str. 65-69 nejsou dostatečně popsány. Formulace výstupů ze statistických analýz jsou poněkud nejasné/nepřesné (př. „Mezi jednotlivými skupinami nebyla prokázána žádná statistická významnost“). Z hlediska pochopení výsledků práce je škoda, že informace ke studovaným polymorfismům autorka cíleně uvádí až v diskuzi a to zdaleka ne v míře, jakou by si zasloužily. Obdobně, k pochopení důvodu pro použití multiplexové PCR u typizace genu *SOD1* by výrazně přispělo včasné vysvětlení, ne až se 13stránkovým zpožděním. V kapitole 3.4, která popisuje použité statistické testy, jsem nenašla, jak byl hodnocen vztah jednotlivých genotypů k hladinám MDA v krvi.

Výsledky a otázky týkající se experimentálního provedení práce a samotného zpracování dat:

1. Podle jakých kritérií byli vybíráni ze souboru jedinci, kterým byla měřena hladina MDA?
2. Proč bylo porovnání mezi více skupinami provedeno t-testem, případně Mann-Whitney testem, a ne pomocí ANOVA, resp. Kruskal-Wallisovým testem? Byla prováděna korekce na mnohočetná porovnání?
3. Graf 23 na str. 67: Je závažnější, že genotyp AG ve skupině T2DM vykazuje chybovou úsečku, když data zřejmě tvoří pouze 1 jedinec (viz graf T2D na Obr. 22). A naopak, je spíše nepravděpodobné, aby skupina tvořená minimálně čtyřmi jedinci vykazovala nulovou chybovou úsečku, jak je tomu u téhož genotypu v kontrolní skupině, tím spíš, že daní jedinci se ve svých hladinách MDA liší, jak patrné z grafu ZK na Obr. 22.
4. V analýzách, kde nebyl mezi skupinami T1DM a T2DM zjištěn statisticky významný rozdíl ve frekvencích studovaných polymorfismů, v hladinách MDA apod., by se nabízelo sloučit obě diagnózy a sledovat studované jevy v porovnání vůči zdravým jedincům. Bylo toto provedeno? (Data k takovému srovnání v práci uvedena nejsou). Tento přístup by byl opodstatněný i vzhledem k tomu, že oba typy diabetu jsou v práci považovány za patologické stavy spojené s oxidativním stresem.
5. Nejvíce nejjasností vidím v analýzách polymorfismu/ů genu *SOD1*:
 - a. Z čeho autorka vyvodila, že absence signálu PCR u genu *SOD1* je v důsledku delece? V práci není vůbec řešeno, o jakou delecii by mělo jít: zda delecii celého genu či delecii části genu v místě, kam nasedá jeden z primerů, jaký fenotyp tato delece má v porovnání k analyzovanému SNP rs2070424, jinými slovy autorka se nezabývá funkčností jednotlivých polymorfismů *SOD1*.
 - b. Co ve skutečnosti autorka potvrdila/zjistila multiplexovou PCR genu *SOD1* s přidanými primery pro beta globin? Odhalí provedená multiplexová PCR krátkou delecii lokalizovanou mezi místy nasednutí obou používaných primerů?
 - c. Jak ověřila, že genotyp AA je skutečně homozygotní genotyp pro variantu A, a ne heterozygotní genotyp A/null (tedy 1 alela A a jedna alela s delecí)? Měla by taková konstituce dopad na funkci enzymu oproti AA a oproti null/null?
6. Co plyne z výstupů této práce? (take-home message)

Závěrem lze říci, že jistou slabinou práce je samotný způsob, jak bylo naloženo s daty získanými v laboratoři. Ve Výsledcích ani v Diskuzi není dostatečně objasněna situace kolem genu *SOD1*. K některým výsledkům je tak obtížné se jakkoliv postavit a vyjádřit, neboť v práci není k dispozici dostatek informací klíčových pro pochopení nálezů, jejich interpretaci a vyvození závěrů, což je s ohledem na odvedenou práci v laboratoři škoda. Přes výše uvedené výhrady je při celkovém hodnocení nutno konstatovat, že předložená diplomová práce splnila zadané cíle. Práci doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení velmi dobře nebo dobře podle kvality obhajoby.