

OPONENTSKÝ POSUDOK
Dizertačná práca

Mgr. Petra Lukášová

Genetické príčiny MODY
(Maturity-Onset Diabetes of the Young)
sledování prevalence mutací „MODY“ genu
v české populaci diabetiku a kontrol

Formálna charakteristika dizertačnej práce:

Dizertačná práca je napísaná na 134 stranách vrátane príloh, je rozdelená na teoretickú časť zaoberajúcu sa históriou, biochemickým mechanizmom, fenotypom a liečbou jednotlivých podtypov MODY 1- 6 (str. 4-44), metodickou časťou, zahŕňajúcou skriningové a preskriningové techniky detekcie mutácií /polymorfizmov (str. 48-72), výsledkovou časťou (str. 73-92) a diskusiou (str. 95-103).

V prílohe je uvedená publikačná aktivita, z ktorej vyplýva, že výsledky autorky boli publikované v 9 časopisoch, z toho v 5 impaktovaných (IF od 1,140 do 3,114). Okrem toho práca bola prezentovaná na početných zahraničných (24) a domácich (19) sympóziách v rokoch 2000-2006.

Dizertačná práca po formálnej stránke vyhovuje príslušným predpisom.

Obsahová charakteristika diela:

Aktuálnosť témy: Téma monogénového diabetu je vysoko aktuálna a v tejto oblasti sa v posledných rokoch uskutočnil najväčší prílev nových – kľúčových poznatkov. Ide najmä o novorodenecký diabetes a Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY), kde nevídaný rozvoj je vidieť nielen v monogénovej podstate týchto ochorení a cieľových génov, ale aj v objave ich kauzálnej liečby. O aktuálnosti zamerania dizertačnej práce nie sú preto žiadne pochybnosti.

Súbory a metódy: Na riešenie problematiky dizertačnej práce autorka zvolila nasledovné súbory: 1. súbor pacientov s MODY tvorí 12 probandov a 10 rodinných príslušníkov, ktorí spĺňajú klinické kritéria MODY, 2. súbor pacientov s gestačným diabetom tvorí 194 žien, u ktorých sa vylúčil DM1, 3. súbor pacientov s DM2, tvorí 339 jedincov diagnostikovaných podľa WHO, 4. súbor 141 zdravých jedincov s históriou diabetu v rodine, a 4. súbor 261 zdravých jedincov bez rodinnej anamnézy DM2.

Všetky súbory sú detailne charakterizované, ako z hľadiska antropometrie, tak aj širokou paletou biochemických analýz, vrátane funkčných testov – trojhodinový orálny glukózový tolerančný test a 15 min inzulínový tolerančný test.

Z doteraz popísaných 6 podtypov cukrovky typu MODY sa predložená dizertačná práca venuje najmä analýze rozličných sekvenčných variantov génu pre MODY2 – glukokinázu. V práci sa využíva rozsiahla paleta pre-skríningových techník detekcie mutácií génu pre glukokinázu, ako je RFLP (promótorový variant -30G>A a variant 292C>T), TGGE analýza (exóny 1a až 7) a SSCP analýza (exóny 1a až 10). Najmä zavedenie posledne uvedených dvoch analýz si vyžaduje metodickú a technickú vyzretosť spojenú s časovou náročnosťou.

Tieto analýzy umožňujú detegovať prítomnosť mutácie, neumožňujú však zistiť presný typ mutácie/polymorfizmu. Na ich presné stanovenie sa v práci preto využíva sekvenačná analýza.

Výsledky práce možno zhrnúť podľa autorky do nasledovných častí:

1. charakteristika súborov
2. skríning sekvenčných variantov v géne pre glukokinázu vo všetkých 4 súboroch
3. výskyt polymorfizmu -30G>A v b-promótoře vo všetkých súboroch
4. výskyt polymorfizmu A98V (292C>T) v géne pre MODY3 (HNF1 α)

Prvú časť týkajúcu sa charakteristiky súborov tvoria výsledky biochemických a antropometrických parametrov, ktoré sa u gestačných diabetičiek a potomkov diabetikov výrazne nemenili v porovnaní s kontrolným súborom. Je zaujímavé, že potomkovia diabetikov majú zvýšené hodnoty glykémie a inzulínémie nalačno, ako aj zvýšené hodnoty glykémie stimulovanej pomocou oGTT. Podobný nález sa pozoroval aj u pacientiek s gestačným diabetom následne po pôrode a po úprave glukózovej tolerancie.

V druhej časti sa autorka venuje zavedením analýz mutácií pomocou TGGE a SSCP techník a ich vzájomnému porovnaniu. Zhoda v detekcii pozitívnych nálezov medzi oboma skríningovými technikami dosiahla 100%. V analyzovaných súboroch českej diabetickej a nediabetickej populácii sa detegovali 2 rodiny MODY s heterozygotnými missense mutáciami v exóne 2, následne potvrdenými sekvenačným prístupom. V prvej rodine sa detegovala nová doteraz nepopísaná mutácia V33A, ktorá korelovala s výskytom ochorenia v rodine. Podobne hodnoty oGTT svedčia o typickom náleze MODY2. V druhej rodine sa našla mutácia popísaná predtým len v českej populácii E40K, čo svedčí o možnom zvýšenom výskyte mutácii v exóne 2. Na druhej strane by bolo zaujímavé poznať detailnejšiu klinickú charakteristiku rodinných príbuzných, ktorí sú nositeľmi uvedených mutácií.

V tretej časti sa autorka zaoberá výskytom jednotlivých genotypov polymorfizmu -30G>A v b promótoře génu pre glukokinázu, detegovaných pomocou RFLP a SSCP analýz. Zo získaných analýz vyplýva, že frekvencia genotypov sa štatisticky výrazne neodlišuje medzi jednotlivými súbormi.

V štvrtej časti jednotlivé varianty polymorfizmu A98V v géne pre HNF1 α sa detegovali pomocou RFLP techniky. Zo získaných analýz vyplýva, že frekvencia genotypov sa štatisticky výrazne neodlišuje medzi jednotlivými súbormi

Podnety a otázky:

K obsahovej stránke prekladanej dizertačnej práce mám niekoľko pripomienok a otázok, ktoré budem uvádzať podľa delenia použitého autorkou.

1. Úvod

na str. 7 prvý odstavce je uvedené, že MODY sa zaraďuje do samostatnej skupiny v klasifikácii diabetu od roku 1998, pričom citácia „expert committee“ je z roku 1999

2. Hepatocytárny nukleárny faktor 4 α

Časť fenotyp a liečba by sa mala rozšíriť o diferenciálnu diagnostiku MODY1, jej odlišenie od ostatných typov MODY, od DM1. Rovnaká pripomienka sa vzťahuje aj na časť fenotyp a liečba v časti glukokináza a hepatocytárny nukleárny faktor 1 α .

3. Glukokináza

Druhý odsek zhora skratka pre permanentný neonatálny diabetes mellitus je PNDM, nie PNMD.

4. Hepatocytárny nukleárny faktor 1 α

Posledný odstavce, 5. veta „Predpokladom úspešnosti terapie je zachovaná dobrá inzulínová senzitivita pacientov“. Nie senzitivita, ale inzulínová funkčnosť, keďže v prípade MODY3 ide o poruchu sekrécie inzulínu a nie zníženej citlivosti na inzulín.

5. Výsledky

Tab 9. a 10 chýbajú hodnoty HbA1c .

Tab 10. obvod brucha u pacientiek s gestačným diabetom. Ako dlho po pôrode bol obvod brucha meraný ? Nemôže byť v porovnaní s kontrolami zväčšený obvod výsledok popôrodného zväčšenia brucha (teda nie akumulácie tuku)?

Tab 9., 10., 11 nie sú vysvetlené skratky v záhlaví tabuliek.

Aká bola liečba probandov a ich rodinných príslušníkov s mutáciami v exóne 2 génu pre glukokinázu. Bolo možné previesť zmenu liečby ? (Skĺbenie náročnej laboratórnej techniky s cieľenou klinickou prácou je výraznou črtou monogénového diabetu).

Asociuje sa nález intrónových variantov IVS4+87C>A a IVS2+1G>A s výskytom diabetu alebo PGT v rodine ? Aká je segregácia genotyp –fenotyp v rodinách ?

Aké je porovnanie variantov polymorfizmu A98V s inými variantmi génu pre HNF1 α , a to I27L a S487N, ktorých polymorfizmus sa asociuje tiež s DM2 ? Ktorý z týchto polymorfizmov má najsilnejšiu prediktívnu hodnotu?

Zhodnotenie a záver:

Predložená dizertačná práca je výsledkom analýzy 4 súborov, v ktorých sa hľadali mutačné varianty génu pre glukokinázu. Zvolený metodický postup je logický, s využitím dvoch pre-skriningových techník a následným potvrdeným abnormálnych výsledkov obojsmerným sekvenovaním, ktoré samotné je ekonomicky a časovo náročné. Je potrebné vyzdvihnúť precíznosť prevedenia jednotlivých techník pri vysokom počte analyzovaných jedincov (967). Zároveň uvedená fenotypická charakterizácia súborov je výborným predpokladom pre riešenie vzťahov fenotyp-genotyp. Na druhej strane sa v predkladanej dizertačnej práci použili klinické kritéria na výber pacientov s MODY ochorením len v prvom súbore. Vyšší výskyt mutácií/polymorfizmov by sa s najväčšou pravdepodobnosťou prejavil pri precíznejšom selektovaní jedincov na základe definovaných klinických kritérií pre MODY. Napriek tomu ide o veľmi dobrú prácu, ktorá vznikla vďaka húževnatosti a precíznosti Mgr. Petry Lukášovej.

Na základe vyššie uvedených výsledkov a publikačnej aktivity autorky,

odporúčam

aby Komisia pre obhajoby dizertačných prác Prírodovedeckej fakulty UK v Prahe udelila pani Mgr. Petre Lukášovej vedecký titul PhD.

Bratislava, 25. júna 2007

Mgr. Daniela Gašperíková, PhD.