

Oponentský posudek disertační práce RNDr. Martiny Divoké „Molekulárně-genetická charakterizace talasemií a hemoglobinových variant v české a slovenské populaci“.

Disertační práce Dr. Divoké se skládá z abstraktu, teoretického úvodu, praktické části, představující cíle práce a jejich splnění včetně komentáře k přiloženým publikacím, diskuse a použité literatury. Přílohou práce jsou publikované práce komentované v praktické části a konferenční příspěvky. Celkově má práce 82 stran textu úvodu (25 stran) a praktické části (57 stran včetně 65 citací literatury a seznamu publikací autorky k tématu), 4 *in extenso* přiložené články publikované/přijaté do tisku v recenzovaných časopisech a 5 abstrakt konferenčních příspěvků.

Cílem práce byla molekulárně-genetická charakteristika hemoglobinopatií vedoucích k vrozeným hemolytickým anemiím a dalších strukturních hemoglobinových variant a poruch globinové syntézy u nemocných z České republiky se zaměřením na talasemické syndromy. Autorka je členkou kolektivu výzkumníků z lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, kteří se dlouhodobě zabývají vysoce specializovanou diagnostikou a výzkumem hemoglobinopatií jako jediné výzkumné centrum tohoto typu v České republice. Jejich výzkum je úspěšný, doložený řadou prioritních pozorování a obhájený články v recenzovaných předních časopisech oboru.

Dr. Divoká ve své práci detailně uvádí svou roli v každém z řešených projektů. Je laboratorním pracovníkem, molekulárním biologem. Do diagnostiky zavedla a aplikuje moderní molekulární metody – mutační analýzy na DNA úrovni, stejně jako standardní diagnostické testy, např. elektroforézu hemoglobinu.

Teoretický úvod seznamuje čtenáře se současným pohledem na vývoj a řízení erythropoezy, tvorbu hemoglobinu a jsou představeny nejčastější hemoglobinopatie, jejich molekulární podstata a diagnostika.

Molekulárně-genetická charakteristika strukturních hemoglobinových variant je představena formou mini-kazuistik vyšetřovaných jedinců/rodin s vrozenou hemolytickou anemií a doložena abstrakty konferencí, publikace dvou prioritních nálezů vzácných hemoglobinových variant Hb Hoshida a Hb Doha v české populaci jsou ve stadiu příprav. Vyšetřený soubor 52 jedinců z 37 rodin s průkazem HbE, Hb Lepore, HbS, HbC, Hb Köln, Hb Knossos, Hb Monroe, Hb Saint Louis, Hb Sydney a zmíněných Hb Hoshida a Doha znamenal stanovení diagnózy pro nemocné a cenný podklad pro další sledování pro jejich lékaře. Bez této vysoce specializované diagnostiky olomouckého pracoviště by zůstala onemocnění nezařazena.

Molekulárně-genetická charakterizace β -talasemických alel u 400 jedinců, žijících v České republice nebo na Slovensku provedená v letech 2002-2015 byla publikována v recenzovaném zahraničním časopisu. Dr. Divoká je zde prvním autorem sdělení. V této obsáhlé práci potvrdila hypotézu, že v naší populaci převažují beta-talasemické alely původem ze Středomoří. Důležitou roli ale mají i lokální unikátní mutace i alely asijského původu. Prakticky vždy se jednalo o formu talasemia minor.

Molekulárně-genetická charakteristika α -talasemií u českých rodin a u rodin cizinců žijících v České republice potvrdila hypotézu, že v české populaci se vyskytují alfa-talasemie daleko častěji než se předpokládalo. Onemocnění bylo moderními diagnostickými metodami prokázáno u 97 jedinců z 81 rodin. V textu jsou detailně představeny typy delecí alfa-globinových genů, včetně delecí unikátních.

Významné zjištění, že alfa-talasemie jsou v české populaci prakticky stejně časté jako beta-talasemie, bylo publikováno v časopisu Transfúze a hematologie dnes a byla tak s tímto klinicky důležitým faktem seznámena široká hematologická veřejnost.

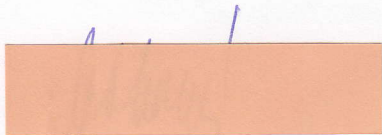
Kromě těchto dvou stěžejních projektů byla dr. Divoká členkou řešitelského kolektivu, který popsal unikátní mutaci redukující beta-globinovou expresi a mající za důsledek fenotyp beta-talasemie. Práce byla publikována v prestižním časopisu Human Mutation v roce 2013. Dalším příspěvkem dr. Divoké k výzkumu talasemií byla analýza pacientů s talasemií minor hodnotící vybrané parametry metabolismu železa včetně hepcidinu. Její publikované výsledky prokázaly neadekvátní potlačení syntézy hepcidinu a zvýšené riziko přetížení železem i u nosičů talasémie.

Dr. Divoká splnila cíle své disertační práce. S kolektivem spoluřešitelů významným způsobem přispěla k poznání o výskytu hemoglobinopatií v České republice, realizovala několik prioritních pozorování etiologie těchto onemocnění a zavedla řadu moderních laboratorních metod zlepšujících diagnostiku těchto v České republice vzácných onemocnění.

Práce je napsána čtivě, bez jazykových chyb či překlepů. Citovaná literatura je adekvátní tématu práce. K předložené práci nemám žádné kritické připomínky. Rád bych znal názor dr. Divoké na perspektivy diagnostiky hemoglobinopatií v éře celogenomových metod. Můžeme očekávat k elektroforéze hemoglobinu, sekvenační, MLPA a PCR analýzám příchod dalších typů vyšetření zjednodušujících a zrychlujících tuto vysoce specializovanou diagnostiku?

RNDr. M. Divoká prokázala ve své disertační práci schopnost tvůrčí vědecké práce včetně jejího obhájení publikací v recenzovaných časopisech. Předloženou disertační práci doporučuji k obhajobě a na jejím základě doporučuji udělení titulu doktor Ph.D.

V Praze dne 17.7. 2016



Prof.MUDr. Jan Starý, DrSc.



OPONENTSKÝ POSUDEK

dizertační práce RNDr. Martiny Divoké „Molekulárně-genetická charakterizace talasemií a hemoglobinových variant v české a slovenské populaci“.

Popis práce

Dizertační práce RNDr. Martiny Divoké byla vypracována v oboru Lékařské biologie pod vedením Mgr. Moniky Horvátové, Ph.D. a prof. MUDr. Dagmar Pospíšilové, Ph.D. Rozsah práce (po odečtení úvodních stránek, obsahu, seznamu prací autorky a seznamu zkratk) činí 73 stran. Teoretický úvod zaměřený na přehled erythropoézy, syntézu hemoglobinu a hemoglobinopatie tvoří z toho prvních 25 stránek. Práce obsahuje 34 obrázků a 6 tabulek. Literární odkazy představují 65 citací, z toho 9 z domácích zdrojů.

Cílem práce byla molekulárně-genetická charakterizace hemoglobinopatií a talasemií diagnostikovaných v České republice a na Slovensku.

Práce je koncipována jako přehled shrnující dlouhodobé výsledky komplexních vyšetření pacientů s talasemií nebo hemoglobinopatiemi provedených v Centru vysoce specializované péče pro dospělé pacienty a děti se vzácnými vrozenými a získanými poruchami krvevotvorby v letech 2002-2015. V diskuzi jsou navíc komentovány publikace autorky věnované tématu dizertační práce. Jde o soubor 4 publikací v recenzovaných časopisech (3 z toho s IF 0,78-5,05). RNDr. Divoká je uvedena na prvním místě ve dvou případech. O dosažených výsledcích autorka ve formě přednášek a posterů referovala na 7 konferencích, z toho na dvou mezinárodních. Je potřebné také zmínit, že všechny publikace ale i dosažené výsledky byly podpořeny 3 grantovými projekty IGA MZ ČR, jedním výzkumným záměrem MŠMT a 7 granty LF UP.

Vyjádření k metodám a formálním aspektům práce

Je nezbytné zdůraznit šíři a různorodost metod, které musely být při řešení problematiky použity. Šlo celkem o 5 bioanalytických testů a 8 metod molekulární biologie, které byly postupně prováděny u jednotlivých pacientů. Celkem bylo vyšetřeno 579 osob se suspektní hemoglobinopatií (jež byla nakonec prokázána u 52 pacientů ze 37 rodin) a 383 pacientů s talasemií. Podíl a tím i přínos autorky k řešení problematiky (včetně podílu na jednotlivých vyšetřeních) je přesně popsán v diskuzi k jednotlivým publikacím. Postup při diagnostice, využití jednotlivých metod a interpretace výsledků jsou na vynikající úrovni, stanovené cíle dizertační práce byly beze zbytku naplněny.

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc

přednosta: doc. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

tel.: +420 588 44 4305, fax: +420 585 428 102

e-mail: dana.bendova@fnol.cz

www.lf.upol.cz a www.fnol.cz



Práce je napsaná přehledně a velmi úsporně, bez zbytečných podrobností. Jednotlivé části na sebe logicky navazují, jazyková úroveň práce je výborná, nepodařilo se mi najít žádné gramatické chyby. Jediným překlepem je uvedení makrocytózy místo mikrocytózy v popisu případu pacientky na str. 56.

Výsledky a přínos práce

Autorka se rámci kolektivu Centru vysoce specializované péče pro dospělé pacienty a děti se vzácnými vrozenými a získanými poruchami krve tvorby podílela významným způsobem na dosažení následujících výsledků:

1. Popis výskytu jednotlivých hemoglobinopatií a talasemií v české a slovenské populaci. V tomto případě autoři doplnili a rozšířili poznatky získané předchozími studiemi. Prokázali například, že alfa-talasemie nejsou v České republice tak výjimečné, jak se doposud předpokládalo a upřesnili frekvenci výskytu některých hemoglobinopatií, jejichž zastoupení bylo v minulosti mylně interpretováno.
2. Prioritní popis nového mechanismu vedoucímu k beta-talasemii (unikátní inserce transkripčně aktivního retrotranspozonu LINE 1 do 2. intronu genu pro beta-řetězec hemoglobinu).
3. Průkaz mechanismu, jenž u pacientů s talasemii chybně léčených preparáty železa vede k relativně vyššímu riziku přetížení organismu železem.

Význam dizertace pro obor Lékařská biologie

Před ne tak dlouhou dobou se v České republice výskyt hemoglobinopatií a talasemií nepředpokládal, pacienti s mikrocytózou byli dlouhodobě zbytečně léčeni preparáty železa. K potvrzení, že tomu tak není, přispěl zejména profesor Indrák se spolupracovníky z Olomouce. Paní doktorka Divoká svým podílem na práci olomouckého centra pro vzácné poruchy krve tvorby a ve své dizertační práci prohloubila a rozšířila dříve dosažené znalosti: upřesnila naše poznatky o výskytu hemoglobinopatií a talasemií v naší republice a pomohla objevit nový mechanismus vzniku talasemie, což má pro obor Lékařské biologie zásadní význam.

Na autorku mám následující otázky:

1. Setkala jste se s požadavky na prenatální diagnostiku talasemií nebo hemoglobinopatií? Jaký je v těchto případech praktický postup při vyšetření?
2. V současné době jsme svědky zavádění nových molekulárně-biologických metod. Jaký

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc

přednosta: doc. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

tel.: +420 588 44 4305, fax: +420 585 428 102

e-mail: dana.bendova@fnol.cz

www.lf.upol.cz a www.fnol.cz



bude podle Vás jejich význam v praktické diagnostice hemoglobinopatií a talasemií?
3. Jedním z prioritních výsledků Vaší práce byl popis nového mechanismu vedoucímu ke vzniku talasemie. Jaká je šance, že v budoucnu budou popsány ještě jiné mechanismy vzniku tohoto onemocnění? Jaké další možné genetické aberace byste v této souvislosti očekávala?

Závěr:

RNDr. Martina Divoká, která se významným způsobem podílí na činnosti olomouckého Centra vysoce specializované péče pro dospělé pacienty a děti se vzácnými vrozenými a získanými poruchami krvevotvorby, ve své dizertační práci prokázala hlubokou znalost řešené problematiky a schopnost koncepční výzkumné práce. Podařilo se jí dosáhnout všech vytyčených cílů a podstatným způsobem tak rozšířit dosavadní znalosti o výskytu a zastoupení jednotlivých hemoglobinopatií a talasemií v České republice a na Slovensku. Výsledky molekulárně-genetických vyšetření dokázala adekvátně interpretovat, což mělo v jednotlivých případech klíčový význam pro stanovení správné diagnózy a tím i pro správný management pacientů. Způsob hodnocení dosažených výsledků, formulace získaných závěrů i jejich diskuse svědčí v plné míře o odborné způsobilosti a vědecké zralosti autorky.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji v souladu s ustanovením § 72 Zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb., aby dizertační práce RNDr. Martiny Divoké byla předložena k obhajobě a při úspěšné obhajobě byla autorce udělena vědecká hodnost Ph.D.

V Olomouci 14. července 2016.



Prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.
Hemato-onkologická klinika
Fakultní nemocnice Olomouc
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
I. P. Pavlova 6
CZ 775 20 Olomouc

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
přednosta: doc. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.
tel.: +420 588 44 4305, fax: +420 585 428 102
e-mail: dana.bendova@fnol.cz
www.lf.upol.cz a www.fnol.cz