

Posudek oponenta disertační práce

Název disertační práce:

Analýza variability počtu kopií v genomu u pacientů s mentální retardací a/nebo poruchou autistického spektra

Autorka: **Mgr. Zuzana Čapková**

Oponent: **MUDr. Renata Gaillyová, Ph.D.**

Autorka se ve své disertační práci zabývá analýzou CNV (variabilita počtu kopií) s využitím metod arrayCGH, SNP aCGH, MLPA a MS MLPA u pacientů s mentálním deficitem a u pacientů s poruchou autistického spektra s nebo bez deficitu mentálních schopností. Výsledky laboratorních genetických testů autorka koreluje s klinickými projevy u pacientů. Srovnává získané nálezy mezi oběma skupinami pacientů.

Práce byla vypracována na Ústavu lékařské genetiky FN Olomouc ve spolupráci s Institutem molekulární a translační medicíny University Palackého v Olomouci a se společností Gennet s.r.o..

Problematika diagnostiky příčin poruch neuropsychického vývoje má na autorčině pracovišti tradici. Ke zdokonalení této diagnostiky přispěla autorka této disertační práce využitím rozšířeného spektra použitých testů a zhodnocením jejich významu. Z hlediska řešeného tématu práce Mgr. Zuzany Čapkové přispívá k rozšíření poznatků o genetických příčinách mentální retardace a poruchy autistického spektra. Současně se autorka snaží nacházet rozdílné i společné fenotypové projevy u pacientů s uvedenými klinickými diagnózami a hodnotí možnou souvislost mezi jednotlivými klinickými znaky a laboratorními nálezy. Svoje výsledky autorka publikovala v autorské práci v tuzemském odborném periodiku a v časopisu PeerJ (online) a také v několika prezentacích na tuzemských a zahraničních odborných konferencích.

Samotná předložená práce má rozsah 60 stran, je dále doplněna seznamem tabulek, obrázků, rovnic, zkratk, seznamem publikovaných prací autorky, rozsáhlým seznamem použité odborné literatury a seznamem příloh. Práce je členěna na kapitoly: Úvod, Poruchy autistického spektra (PAS), Mentální retardace (MR), Vybrané fenotypové znaky doprovázející MR a PAS, Genetické příčiny MR a PAS a jejich klinická diagnostika, Cíle práce, Materiál a metodika, Výsledky, Diskuse, Závěr, Seznam publikované literatury, Seznam tabulek, Seznam obrázků, Seznam rovnic, Seznam příloh, Seznam zkratk, Použitá literatura a Přílohy.

Při hodnocení předložené disertační práce jsem posuzovala následující oponentská kritéria:

1/ Seznámení s problematikou

V práci je podrobně popsán klinický obraz a nejčastější genetické příčiny studovaných onemocnění i přehled metod vhodných a využívaných pro genetickou diagnostiku těchto stavů. Celý úvod má přehlednou a logickou stavbu, tvoří asi třetinu práce. V tabulce číslo 1 (strana 4) by bylo možné ještě doplnit i číselné kódy MKN-10 pro PAS, pokud jsou uvedeny pro MR v tabulce 2 (strana 9).

2/ Cíle disertační práce

Cíle práce jsou jasně formulovány a jsou velmi rozsáhlé.

Autorka si klade za cíl provést:

- I. Analýzu klinických dat pacientů s mentální retardací (MR) a poruchou autistického spektra (PAS)
- II. CNV analýzu pacientů s MR a PAS
- III. CNV analýzu u pacientů s MR a PAS metodami MLPA, MS MLPA, aCGH a SNP aCGH
- IV. Vyhodnocení dat získaných CNV analýzou
- V. Porovnání dosažených výsledků CNV analýzy mezi MR a PAS
- VI. Korelaci klinických a genetických dat u pacientů s MR a PAS
- VII. Stanovení významu vybraných klinických znaků na výsledky CNV pro skupiny pacientů s PAS a MR
- VIII. Analýzu klinického obrazu pacientů s opakujícími se variantami neznámého významu

3/ Aktuálnost zvoleného tématu, význam disertace pro obor

V posledních letech dosahuje genetická diagnostika stále většího významu. Díky novým technologiím umožňuje stanovit příčinu patologického klinického stavu. S vysokou citlivostí lze detekovat varianty, přesně určit diagnózu a tyto nálezy využít pro následnou korelaci genotypu a fenotypu. Genetická diagnostika umožňuje v rodinách, kde je příčina nemoci odhalena, využít preventivní postupy, které mohou snížit riziko opakovaného výskytu stejného onemocnění v rodině. Problematika MR a PAS tvoří velmi rozsáhlou a komplikovanou skupinu onemocnění, kde zjištění etiologie je stále ještě velmi obtížné. Práce, kterou autorka předkládá, se tedy věnuje velmi aktuálnímu tématu a může přispět k dalšímu pokroku v této oblasti. Provádění spolehlivých a cíleně zaměřených genetických testů u pacientů s MR a PAS je velmi žádoucí.

4/ Použité metody v rámci disertační práce a postup řešení

Práce zpracovává nálezy od celkem 204 pacientů s MR a/nebo PAS, u kterých byla vyloučena vrozená chromozomová aberace a syndrom fragilního X chromozomu, které byly získány metodami MLPA, MS MLPA, a-CGH a SNP aCGH. Všechny použité metody jsou přehledně popsány, včetně hodnocení zjištěných variant a statistických analýz.

5/ Stručný rozbor výsledků disertační práce

Výsledky práce jsou detailně popsány v textu a shrnuty v tabulkách. Jako tabulka číslo 16 je chybně uvedena druhá část tabulky číslo 15, čímž číslování dalších tabulek nesouhlasí se seznamem. Získané výsledky autorka podrobila vytčeným korelacím. V závěru kapitoly „Výsledky“ popisuje autorka kasuistiky pacientů, u kterých se objevila opakovaně stejná varianta. V této části jsou nepřesnosti v terminologii, které mohou být pro „nelékaře“ pochopitelné, ale předložené práci ubírají na kvalitě a je škoda, že nebyly diskutovány s klinickými genetiky. I obrázky v této části práce nemají standardní kvalitu.

Zjištěné výsledky srovnává autorka s dříve zjištěnými literárními údaji v kapitole „Diskuse“. Pohled na významnost některých klinických znaků u pacientů s MR a PAS pro výběr diagnostického postupu je zajímavý.

Přesto bych doporučila dokončení diagnostického postupu vyšetřením obou rodičů u vyššího počtu pacientů. Ve více než polovině pacientů není původ zjištěné varianty známý. To zvláště při nálezu varianty nejasného významu snižuje výpovědní hodnotu těchto výsledků.

6/ Nové poznatky disertační práce a její význam pro společenskou praxi a pro další rozvoj oboru

Komplexní genetická diagnostika u pacientů s MR a PAS je velmi důležitá především z hlediska genetického poradenství v rodinách, svůj význam má i pro správnou péči a terapii. Výsledky předložené práce jsou dalším vhodným doplňkem do mozaiky diagnostických možností, které současná lékařská genetika může v rodinách těchto pacientů využít.

7/ Jazyková úroveň, formální úprava

Po formální stránce je předložená práce zpracována standardně, ale ne zcela pečlivě. V textu jsou na některých místech použity různé typy písma (např. strana 22). Ne zcela správný je např. zápis karyotypu s mezerou (strana 12). V textu shledávám některé jazykové i stylistické nedostatky, což činí některé části obtížně pochopitelné, jazyková neobratnost a nepřesnosti jsou v popisu kasuistik v kapitole „Výsledky“. Použití značky % pro popis v rámci hodnocení výšky, hmotnosti či obvodu hlavy pacientů není zcela obvyklé. Vhodnější by bylo použít rozepsaný termín percentil. Kvalita použitých obrázků je nízká.

Závěr:

Jako posuzovatelka hodnotím práci především v rozsahu své specializace klinického genetika.

V předložené práci shledávám některé formální nedostatky, které zbytečně snižují úroveň práce a pokud je to možné, doporučila bych ještě využít možnosti dopracování, korektury jazykové, opravu terminologie, písma.

V předložené práci autorka dosáhla svých vytyčených cílů.

Studentka **prokázala samostatné tvůrčí schopnosti** a její práce obsahuje původní a uveřejněné výsledky. Požadavky kladené na disertační práci jsou tedy splněny, a proto ji **doporučuji k obhajobě po stránce odborné, nikoli po stránce formální a jazykové.**

Na základě výše uvedených skutečností doporučuji, s výše uvedenou výhradou, tuto práci přijmout k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby doporučuji uchazečce udělit akademický titul Ph.D.

V Brně dne 10.1.2020

MUDr. Ren

Oddělení

Fakultní nemocnice Brno

Na studentku mám následující dotazy:

1. Plánujete do komplexní genetické diagnostiky pacientů s PAS a MR zařadit využití nových sekvenačních technik? Jaká by byla jejich výhoda oproti doposud používaným metodickým postupům uvedeným ve vaší práci? Jaké by byly jejich nevýhody či komplikace.
2. Uvádíte doporučení odborné společnosti, aby v prvním kroku byl u pacientů s MR stanoven karyotyp a vyloučena expanze *FMR1* genu. Jaký byste navrhla diagnostický algoritmus dalších genetických laboratorních vyšetření pro pacienty s normálním nálezem v těchto dvou

vyšetřeních. Byl by algoritmus pro skupinu pacientů s MR a PAS zcela identický nebo by bylo vhodné doporučit dva přístupy.

3. Jak lze hodnotit závažnost varianty neznámého významu bez zjištění přítomnosti či nepřítomnosti této varianty u rodičů pacienta a jaké jsou potom možnosti pro genetickou konzultaci takového nálezu v rámci genetického poradenství.



Disertační práce Mgr. Zuzany Čapkové „**Analýza variability počtu kopií v genomu u pacientů s mentální retardací a/nebo s poruchou autistického spektra**“ má 85 stran textu a obsahuje 24 tabulek a 15 obrázků. Bohužel nejsou k práci přiloženy „in extenso“ publikace autorky, které se rovněž věnují zpracovávané problematice (jeden přehledový článek z českého písemnictví a dvě původní práce recentně publikované v renomovaných zahraničních časopisech).

Po úvodní obecné kapitole, která obsahuje podrobné teoretické podklady vycházející ze současného písemnictví a vlastních zkušeností Mgr. Čapkové, jsou uvedeny výsledky vlastního výzkumu.

Ve své práci se autorka věnuje problematice genetického podkladu poruch autistického spektra (PAS) a mentální retardace (MR) s ohledem na skutečnost, že numerické a strukturální změny chromozomů detekovatelné vyšetřením karyotypu jsou přítomny jen u malých procent těchto pacientů. Z písemnictví je známo, že na vzniku MR a/nebo PAS se podílí chromozomální změny (ztráta nebo zisk genetického materiálu) zasahující méně než 5 Mb. Tyto submikroskopické změny je možné stanovit pomocí metod. molekulární cytogenetiky, které mají větší výpovědní hodnotu, zejména pokud se korelují s klinickým obrazem. Jednou z nich je stanovení variability počtu kopií genomu (CNV). Některé z těchto strukturních změn chromozomů se vážou ke známým genetickým syndromům s typickou symptomatologií (Praderův-Williho, Angelmanův, Williamsův sy, apod), u kterých je vysoké riziko PAS, ale je popsáno i mnoho dalších nesyndromických genomických aberací, které se vážou k MR a PAS.

U početné kohorty pacientů ($n = 204$) s MR a/nebo PAS, u kterých byly vyloučeny metabolické vady, syndrom fragilního X a chromozomální aberace vč. větších strukturálních změn, stanovila doktorandka variabilitu počtu kopií genomu (CNV) s cílem:

1. pomocí statistických metod porovnat získané výsledky CNV pacientů s MR a PAS,
2. korelovat výsledky CNV s jejich klinickým obrazem,



3. u jedinců s opakujícími se variantami neznámého významu podrobně analyzovat jejich klinický obraz.

Složitá metodika vyšetření je v předkládané práci podrobně popsána.

Faciální dysmorfie, kraniální malformace a vrozené vývojové vady vnitřních orgánů a skeletu byly statisticky významněji zastoupeny u jedinců s čistou MR, zatímco ADHD se vyskytovala častěji u pacientů s PAS (18,9 % vs. 37,7%).

CNV byla častější u pacientů s MR, u pacientů s PAS bez mentálního defektu a dysmorfických rysů nebyly klinicky významné CNV nalezeny.

Předkládaná dizertační práce splnila své cíle. Jejím výstupem jsou důležité závěry pro praxi, které jsou určeny nejen genetikům, ale především neurologům, pedopsychiatřům a i lékařům první linie, kteří indikují pacienty ke genetickému vyšetření.

Jde o identifikaci klinických příznaků (zejména faciální dysmorfie, kraniální malformace, vrozených vývojových vad vnitřních orgánů, skeletu, intrauterinní růstová restrikce, apod) a jejich stratifikaci směřující k podezření na **případný rozvoj časného mentálního defektu spíše než na čistou poruchu autistického spektra (bez MR) již od raného věku, kdy je poměrně těžké a někdy dokonce nemožné tyto dvě klinické jednotky oddělit.**

Práce je dalším významným příspěvkem k tomu, že díky možnostem molekulární genetiky se i v psychiatrii rozšířila možnost odhalení případné genetické příčiny onemocnění, což je velký přínos pro pacienta a jeho rodinu, kterým umožňuje lépe pochopit podstatu jeho odlišnosti.

Při celkovém hodnocení práce Mgr. Zuzany Čapkové oceňuji její samostatnou práci při vyšetřování biologického materiálu u poměrně početných souborů pacientů a také originalitu při volbě hypotéz u obou skupin pacientů. Významný je dosud nepublikovaný



závěr, že u pacientů s vysokofunkčním autismem nebo Aspergerovým syndromem je mimo CNV analýzy užít genetických metod s vyšším rozlišením (WES, WGS, apod.). Práce je přehledná, formálně velmi dobře zpracovaná, psána výbornou, gramaticky bezchybnou češtinou.

K autorce mám následující dotazy:

1. Jakým způsobem byla selektována skupina pacientů s PAS a MR? Šlo o náhodný výběr např. jen doporučení dětským lékařem případně psychologem nebo se dg. opírala o jednoznačný nálezn pedopsychiatra v případě PAS a neurologa v případě MR?
2. V jakém průměrném věku byla stanovena dg. PAS s MR a čistého PAS bez MR (bylo-li to z dostupných dat to známo)?
3. PAS je častější u chlapců než u dívek. Je pro tuto gendrovou nevyváženost v literatuře vysvětlení?
4. Jakou roli hraje v patogenezi PAS a MR epigenetika? Pokud ano, uvažuje se o možné epigenetické terapii jako nap. u syndromu Pradera a Williho?
5. Jaké jsou časové rozdíly v získání výsledků CNV analýzy ve srovnání WES, příp. WGS? Jaký je finanční rozdíl mezi těmito vyšetřeními?

Předkládaná disertační práce Mgr. Zuzany Čapkové splňuje všechna kritéria pro její úspěšné obhájení a udělení akademického titulu Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci 11. ledna 2021

doc. MUDr. Jiřina Zapletalová, Ph.D.