

**Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Evy Al Taji  
na téma**

**Pathophysiology of primary congenital and early-onset hypothyroidism**

Předložená práce je zpracována v anglickém jazyce, na 151 stranách textu, dalších 8 stran obsahuje seznam publikací autorky, na závěr jsou přiloženy kopie vybraných publikací v českém jazyce.

Vlastní práce je členěna na teoretický úvod (8 stran), obecný popis cílů práce, způsobu získávání pacientů do studií a použitých laboratorních metod (celkem 3 strany) a popis designu dvou studií, které jsou základem práce (2 strany). Následuje úvod k 1. studii („Thyroid transcription factors“) (10 stran) a fulltext publikace v anglickém jazyce (23 stran, autorka je 1. autor). Podobně 2. studie („Genetic background of thyroid dysmorphogenesis“) je tvořena obecným úvodem (6 stran) a následuje 1. část („Screening for TPO mutations“), kterou tvoří fulltext publikace v anglickém jazyce (22 stran, autorka je 1. autor) a 2. část („Pendrin and its role in pathogenesis of congenital and non-congenital goitrous hypothyroidism“), kterou opět tvoří fulltexty 2 publikací v anglickém jazyce (17 resp. 21 stran, autorka je 2. resp. 3. autor). Následují závěrečné shrnující poznámky (6 stran) a příloha obsahující detailní popis použitých molekulárně genetických metod (10 stran).

Seznam citované literatury je dostatečný (232 citací), jsou uvedeny jak zásadní citace staršího data, tak citace recentní. Formální úprava a citací je jednotná v každé z originálních publikací i v celkovém seznamu literatury.

**Úvod** je stručný a přehledný. Informuje o prevalenci kongenitální hypotyreózy (CH), zdůrazňuje zásadní význam novorozeneckého screeningu v diagnostice CH. Dále uvádí klasifikaci vrozené hypotyreózy a přehled dosud známých genů, jejichž mutace způsobují CH a fenotyp jednotlivých jejich forem. Úvod je věnován převážně genetickým formám vrozené hypotyreózy, které jsou nečastější.

**Sběr dat.** Cenná DNA banka, která tvoří základ této práce, byla získána sběrem krevních vzorků a fenotypových dat pacientů s kongenitální hypotyreózou a časně postnatálně

manifestovanou neautoimunitní hypotyreózou z celé České republiky - v rámci screeningu neonatální hypotyreózy v letech 1985-2002. Sběru vzorků a fenotypových dat se účastnilo 8 hlavních center pediatrické endokrinologie. Klinická data byla získávána dotazníkovou metodou. Selektovaný soubor použitý v této práci je dostatečně velký - celkem 193 pacientů (130 dívek a 63 chlapců), z toho 190 s CH a 3 s časně postnatálně manifestovanou hypotyreózou. Pacienti byli dále rozděleni na základě morfologie štítné žlázy na 2 skupiny: 170 pacientů bez strumy a 23 se strumou.

**Metody.** Použité molekulárně genetické metody jsou dostatečně popsány jak v originálních publikacích, tak souhrnně v kapitolách 2.4.2. a především v kapitole 6.

### **Výsledky.**

Ve studii 1 (Tyreoidální transkripční faktory) byly vyšetřovány mutace genu pro transkripční faktor PAX8 u selektovaného souboru 170 pacientů s CH bez strumy a s časnou postnatální hypotyreózou bez strumy a u 20 pacientů s jinými kongenitálními malformacemi byly navíc vyšetřovány mutace genů pro transkripční faktory NKX2.1/TTF1, FOXE1/TTF2, NKX2.5, PAX8 a HEX. Byla identifikována nová mutace G→C v pozici 155 genu PAX8 vedoucí k změně arginin→prolin kodonu 52 (R52P) u chlapce s časnou postnatální involucí štítné žlázy, vedoucí k časně manifestované postnatální hypotyreóze. Stejná mutace byla nalezena i u jeho matky a babičky z matčiny strany (obě léčeny pro časně se manifestující hypotyreózu). Autorka detailně popsala mechanismus, kterým tato mutace vede ke ztrátě funkce PAX8 (porucha vazby PAX8 na promotor genu pro tyreoglobulin). Výsledky jsou obsaženy v publikaci „Screening for mutations in transcription factors in Czech...“, tato práce byla opakovaně citována.

Ve studii 2 (Genetický podklad tyreoidální dyshormonogeneze) v 1. části byly vyšetřovány mutace genu TPO u selektovaného souboru 22 pacientů s CH se strumou - tato práce je prvním systematickým screeninem mutací TPO u vrozené hypotyreózy v České republice. Mutace obou alel genu TPO byly zjištěny pouze u 2/22 pacientů (u 1. pacienta 1 nová a 1 známá delece vedoucí k „frameshift“ a u 2. pacienta 1 známá mutace vedoucí k „frameshift“ a 1 dosud nepublikovaná „nonsense“ mutace), u 3/22 pacientů byly zjištěny mutace jedné alely TPO. Výsledky jsou obsaženy v publikaci „Goitrous congenital hypothyroidism: low mutations rate...“

V 2. části byly vyšetřovány mutace genu pro pendrin (gen PDS/SCL26A4) u pacientů klinickou diagnózou Pendredova syndromu (hypotyreóza + senzorineuronální porucha

sluchu) - 3 s CH a strumou a 1 s časne manifestovanou postnatální hypotyreózou a strumou. Mutace genu PDS/SCL26A4 byly zjištěny u 2/3 pacientů s CH a strumou (u obou pacientů 1 známá a 1 nová mutace). Dále byla mutace genu pro Pendrin potvrzena u mladé ženy s senzorineuronální poruchou sluchu a postnatální hypotyreózou s polynodózní strumou. Tyto kazuistiky jsou popsány v publikacích „Pendred syndrom among patients...” a „Thyroidectomy in a patient with multinodular dys-hormonogenic goitre...”

### **Diskuze**

Diskuze je vedena zvláště ke každé studii a na závěr jsou připojeny shrnující poznámky. V diskuzi ke studii 1 je konstatována velmi nízká frekvence mutací NKX2.5, NKX2.1, PAX a FOXE1 u CH (v této studii nezjištěna žádná mutace). Ačkoliv autorka prokázala pouze jednu novou mutaci genu PAX8, jde o důležitý poznatek, protože nositelé této nové mutace R52P by mohli unikát novorozeneckému screeningu. Autorka doporučuje genetické vyšetření mutace PAX8 u dětí s negativním novorozeneckým screeninem a rozvojem časne manifestované postnatální hypotyreózy.

V diskuzi ke studii 2 je v první části diskutována neočekávaně nízká frekvence mutací genu pro TPO v České republice oproti ostatním evropským zemím, kde byla vyšetření prováděna. Podle autorky může být vysvětlením odlišná distribuce mutací uvnitř TPO genu, nízká frekvence mutací TPO u CH v ČR může však být i realitou a je třeba hledat jiné geny. Dále autorka zdůrazňuje, že mutace TPO mohou spojeny s nekontrolovatelným růstem strumy, s folikulárními adenomy a karcinomem štítné žlázy - pokud není dostatečná léčba tyreoidálními hormony a pacienti mají dlouhodobě zvýšené TSH.

V 2. části jsou diskutovány kazuistiky zjištěných mutací PDS/SLC26A4 u pacientů s Pendredovým syndromem. Autorka v diskuzi upozorňuje, že uzlové strumy u pacientů s Pendredovým syndromem jsou častěji maligní a tito pacienti musí být často kontrolováni ultrazvukem nebo musí dokonce podstoupit operaci, pokud nelze adekvátní léčbou udržet hodnoty TSH v normálním rozmezí.

### **Publikace**

Publikace autorky, které jsou součástí předložené disertační práce jsou kvalitní, uveřejněné v časopisech s vysokým impact faktorem a jedna z nich byla několikrát citována. Jsou dostatečné co do počtu i kvality.

## **Připomínky**

- S ohledem na název práce („Pathophysiology of primary congenital and early-onset hypothyroidism“) by mohlo být v teoretickém úvodu věnováno o trochu více prostoru negenetickým formám primární CH (pouze 14 řádků textu na s. 17).
- Legenda k obrázku 1, schématu 3, tabulce 1 a text v publikaci „Screening for mutations in transcription factors in Czech...“ by měly obsahovat informaci o „normální“ velikosti štítné žlázy novorozenců - přítomnost „strumy“ je hlavní kritérium základního fenotypového rozdělení studovaného souboru. Následně je v textu na str. 43 uvedena „normální“ velikost štítné žlázy v 18 měsících věku ( $1,39 \pm 0,31$  ml) a 3 letech věku ( $1,82 \pm 0,53$  ml). „Normální“ velikost štítné žlázy novorozenců je v textu sice uvedena, ale na jiném místě - v kapitolách 4.2. a 4.3. na straně 71 a 92.
- V tabulce 1 chybí negenetické příčiny transientní vrozené hypotyreózy (jodový deficit, nadbytek jodu, inhibiční protilátky proti TSH receptoru, léčba matky tyreostatiky), které (jak autorka sama udává) jsou přibližně stejně časté jako geneticky způsobené dyshormonogeneze (1:25000 resp. 1:30000).
- V textu na straně 21 na konci kapitoly 2.4.1. a na straně 23 v úvodu kapitoly 2.5. jsou pacienti rozděleni dle morfologie na skupiny: CH způsobená tyreoidální dysgenezí, CH s normální štítnou žlázou, CH způsobenou dyshormonogenezí a časně postnatálně manifestovanou neautoimunitní hypotyreózu. Toto dělení ne zcela odpovídá schématu 3, na které je v textu odkazováno. Z textu není jasné, kam patří CH s „normální“ štítnou žlázou (lze předpokládat, že do skupiny „se strumou“ dle schématu 3). Další odlišné dělení pacientů („Thyroid dysgenesis, Normal thyroid, Not available“) je použito v publikaci „Screening for mutations in transcription factors in Czech...“
- V diskuzi ke studii 1 by mohly být více rozebrány (nebo alespoň uvedeny příklady) uvažovaných epigenetických mechanismů vedoucích k předpokládané inaktivaci kandidátních genů.
- V legendě ke schématu 6 chybí vysvětlení zkratky OAE.
- Protože je práce koncipována jako soubor hlavních fulltextových publikací autorky, nelze se vyhnout duplicitám a určité nepřehlednosti textu. Souhrn a autoreferát jsou naopak zpracovány velmi přehledně.

Výše uvedené připomínky nejsou zásadního významu a nijak nesnižují kvalitu přeložené práce.

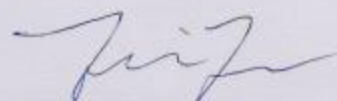
## Otázky

- 1) Je známo něco o fenotypu heterozygotů mutací NKX2.1/TTF1, PAX8, FOXE1/TTF2 a NKX2.5 u lidí? Jak autorka uvádí, je u heterozygotních myši popisována mírná elevace TSH (Mansouri 1998 a Pohlenz 2002). Zabýval se někdo frekvencí těchto mutací u dospělých s neautoimunitními formami subklinické hypotyreózy? Přinášejí tyto mutace pro heterozygoty nějaká zdravotní rizika? (autorka uvádí, že např. u PAX8 mohou být nosiči asymptomatictí). Autorka doporučuje genetické vyšetření mutace PAX 8 u dětí s negativním novorozeneckým screeningem a rozvojem časné manifestované postnatální hypotyreózy. Měly by být také vyšetřeny děti s neautoimunitní hypotyreózou v rodině (genetika, opakovaně vyšetření TSH)?
- 2) Vyšetřoval někdo výskyt mutací TPO a genu pro pendrin u dospělých osob s karcinomy štítné žlázy?

## Souhrn

Celkově lze říci, že vybrané téma je zpracováno na velmi vysoké úrovni jak po faktické, tak po formální stránce. Autorka a spol. objevila několik nových, dosud nepoznaných mutací genů PAX8 a TPO, z nichž především identifikace nové mutace R52P genu pro PAX8 (jejíž důsledkem může být časné postnatálně se manifestující hypotyreóza) má velký klinický význam, protože její nosiči mohou unikat novorozeneckému screeningu vrozené hypotyreózy.

Protože předložená práce splňuje všechna potřebná kritéria, doporučuji udělit MUDr. Al Tají titul Ph.D.



MUDr. Jan Jiskra, PhD.

Praha 25.3.2009

3. Interní klinika 1. LF UK a VFN Praha

Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta  
III. Interní klinika  
U nemocnice 1, 128 08 Praha 2  
Tel.: 2491 6603, fax: 2491 9780