

Oponentský posudek na magisterskou práci Venduly Zemanové

Vztah Leidenské mutace a rezistence na aktivovaný protein C

Autorka se ve své diplomové práci věnuje problematice vrozených trombofilních stavů a jejich vztahu s rezistencí na aktivovaný protein C. Měla možnost využít přístup k datům z hematologické a genetické laboratoře Nemocnice v Českých Budějovicích a také ke klinickým datům jednotlivých pacientů. Všechna data byla zpracovávána anonymně. Považuji za velmi přínosné, že studenti oborů Klinická biologie a Biomedicínská laboratorní technika mají možnost v rámci svých diplomových prací spolupracovat s českobudějovickou nemocnicí a studovat vztahy mezi různými biomarkery, mutacemi, a patologiemi. Studenti si tak mohou vyzkoušet, jak probíhá analýza klinických dat, a mohou získat zkušenosti, díky nimž budou po absolvování studia schopni zastat pozici bioanalytika.

Nicméně analýza klinických dat vyžaduje, aby byla maximální pozornost věnována výběru správné metodiky, jakou budou data srovnávána. V experimentální biologii ideálně sledujeme jednu proměnnou, a to z důvodu minimalizace počtu faktorů, ovlivňujících výsledek. Například používáme maximálně geneticky shodné (inbrední) kmeny myši. Pokud sledujeme klinická data pacientů, jsme postaveni před široké spektrum faktorů, které mohou ovlivnit naše pozorování. Tato skutečnost je dobře známa, a proto existují statistické metody (vícerozměrné regrese), které umí odfiltrovat nebo zohlednit mnoho sledovaných faktorů najednou. S větší přesností pak můžeme určit vliv jednoho konkrétního faktoru na sledovaný parametr. Předkládaná práce bohužel vykazuje základní nedostatky ve zpracování dat, což je velká škoda a její největší slabina, spolu s nedostatečnou prací s referencemi a dostupnou literaturou. Oba nedostatky rozeberu podrobněji při hodnocení jednotlivých oddílů.

Úvodní rešerše k tématu je napsána srozumitelně a celkově působí dobrým dojmem. Nicméně musím velmi kritizovat nedostatečnou práci s dostupnou literaturou. Autorka téměř výlučně (až na 4 výjimky) cituje lékařské učebnice, z nichž většina je už zastaralá. Dokonce cituje Wikiskripta. Jak nadměrné citování učebnic, tak citování Wikipedie a jiných internetových zdrojů studentům velmi nedoporučujeme a každoročně na tyto základní chyby při psaní diplomek poukazujeme při katedrových seminářích. Jedním z účelů diplomové práce je naučit se práci s vědeckou literaturou, práce s databázemi, s anglickými texty atd. Téměř výhradním použitím českých učebnic se autorka této výzvě vyhnula a velmi si tak usnadnila práci. Navíc se autorka věnuje tématu, k němuž lze ve vědeckých databázích dohledat tisíce vědeckých článků, které se zabývají přímo zadaným tématem, a proto i rešerše mohla shrnout nejnovější poznatky a diskuze mohla výsledky důkladněji porovnat s literaturou. Jen pro informaci, pokud do databáze PubMed zadám heslo *Activated protein C resistance Leiden*, vyskočí **969** prací, experimentálních, klinických i souhrnných, např. jen z roku 2017:

Baraban E, Siddon A, Tormey C. **Discordance Between Functional Screening and Genetic Confirmatory Diagnostic Tests: A Retrospective Analysis of Activated Protein C Resistance and Factor 5 Leiden Testing Over a 5-Year Period.** Am J Clin Pathol. 2017 Mar 1;147(suppl_2):S163-S164

Perez Botero J, Majerus JA, Strega AK, Johnson RD, Chen D, Pruthi RK. **Diagnostic Testing Approaches for Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden: A Comparison of Institutional and National Provider Practices.** Am J Clin Pathol. 2017 May 2.

Použití obrázků genu pro protein C nebo proteinu Faktor V z 22 let staré učebnice je nevhodné. Další připomínky a otázky k úvodu jsou tyto:

Obr. 15 ukazuje mutaci v jednom tripletu, ale v aminokyselině není rozdíl. **Co kóduje triplet CGA a co CAA?** Na str. 25 autorka uvádí, že APCR může být kromě jednobodové mutace v genu pro FV způsobena neznámým defektem. Citována je učebnice z roku 2004. **Je možné, že jde o zastaralou informaci? Jaké jiné příčiny má APCR?**

Cíle práce jsou srozumitelně definovány, i když bych spojení ...cílem práce je vztah Leidenské mutace... nahradil ...cílem práce je **analyzovat** vztah Leidenské mutace...

Diagnostické metody předpokládám autorka sama nepoužívala, ale jsou popsány dostatečně. Na str. 36 se píše, že specifickým aktivátorem proteinu C je hadí jed. **Jaká konkrétní složka hadího jedu je tím aktivátorem?**

Autorka vyhodnotila úctyhodný vzorek pacientů z hematologické a genetické laboratoře (1897, resp. 3237 pacientů), z toho vyčlenila 610 pacientů s Leidenskou mutací. Nakonec však skončila s 55 pacienty, k nimž šla dohledat i klinická data. Z nich bylo 32 s pozitivním a 23 s negativním klinickým nálezem. To jsou bohužel poslední čísla, představující počet pacientů v jednotlivých skupinách. Toto je prvním pochybením při analýze dat, protože velikost zkoumané skupiny je jedna z nejpodstatnějších informací. **Od grafu 3 dále postrádám u grafů informaci o tom, co a v jakých jednotkách je prezentováno.** Jednotky pro graf 3 jsou popsány v textu, což je nedostatečné a navíc není příliš vhodné prezentovat data v různých jednotkách v jednom grafu. Graf 4 je vyjádřen v procentech. Není však uvedeno, k čemu se procenta vztahují. **Co je 100%?**

Mimochodem u všech sloupcových grafů chybí chybové úsečky, které jsou velmi důležité pro vyhodnocení rozptylu hodnot. **V prezentaci je třeba ukázat grafy s chybovými úsečkami, a to buď směrodatnou odchylku (SD) nebo standardní chybu průměru (SEM).** Stejně tak je třeba uvést velikost jednotlivých porovnávaných skupin. Na grafech 7 a 8 je vidět nedostatek statistického zpracování. Graf je pouze popisný, nedá se z něj vyčíst žádná závislost či korelace. Navíc autorka uvádí, že hodnota D-dimerů je ovlivněna graviditou, ta však není nikde zohledněna. Podobně obr. 8 pouze ukazuje průměry hodnot APCR a D-dimerů pro jednotlivé diagnózy, ale k určení toho, zda existuje nějaká korelace mezi diagnózou, hodnotou APCR a D-dimerů je třeba srovnávat s fyziologickým stavem, tj. negativním klinickým nálezem. Zde už by byla namísto vícefaktorová analýza, což není triviální analýza, ale vzhledem k tomu, že práce je založena výhradně na analýze klinických dat, předpokládám bych, že autorka vyvine větší úsilí směrem k nalezení správného přístupu. Podobně tak na obr. 9. U obr. 10 mi chybí rozdělení na muže a ženy, vzhledem k významnému vlivu gravidity na hladinu D-dimerů.

V diskuzi na str. 47, kde autorka píše: „Ne vždy nízká hodnota APCR znamená přítomnost klinického projevu. Například pacient X má hodnotu APCR 1,82 s 1 klinickým projevem (potrat). Avšak pacient Y má hodnotu APCR 0,84 a přesto je bez klinických projevů.“ Přesně z tohoto důvodu se používá statistické vyhodnocení, abychom zjistili, zda existuje nějaká tendence, když se vyhodnotí větší počet pacientů. Str. 48 první odstavec – autorka uvádí, že graf 5 ukazuje viditelně nižší hodnoty, atd... Ve vědě platí pouze statistická průkaznost, očividnost může být zavádějící. U grafu č. 7 a 8 autorka zmiňuje možný vliv těhotenství – **Měla autorka informaci o těhotenství pacientů? Bylo možné oddělit skupinu těhotných žen?** V dalším odstavci autorka zmiňuje chybu malých čísel, tj. chybu způsobenou malým počtem jedinců ve skupině, kde jedna vybočující hodnota změní významně průměr skupiny. Právě proto se v grafech uvádí směrodatná odchylka, případně střední chyba průměru.

Autorka ke konci diskuze zmiňuje možné předpovědní metody pro trombózy, např. počty destiček. Cituje učebnici z roku 1999. Zajímalo by mě, jaké jsou nejnovější metody predikce trombotických stavů. **Ocenil bych, kdyby tuto informaci autorka vyhledala v nějaké odborné souhrnné práci.**

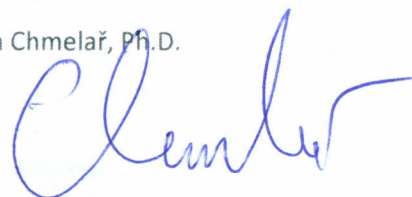
Celkově je vidět, že autorka práci věnovala dostatek času a pozornosti a o téma se zajímá. Nicméně vzhledem k tomu, že je studentkou PŘF již dlouhá léta, měla by vědět, jaké jsou základní požadavky jak pro práci s vědeckou literaturou, tak na diplomové práce. Dále vzhledem k tomu, že hlavní náplní práce bylo zpracování klinických dat a zjišťování vztahů mezi různými faktory, měla autorka svou

pozornost napřít směrem ke správnému použití vhodných statistických metod, protože jediné tak lze jakoukoliv závislost a příčinný vztah odhalit. Autorka bezpochyby ví nebo by vědět měla, že na PŘF působí celá řada odborníků na statistiku, ochotných konzultovat statistické problémy, existuje několik kurzů – Biostatistika či Statistika v preklinickém a klinickém výzkumu. Proto nelze základní nedostatky v prezentaci a vyhodnocování dat přehlédnout.

Práci Venduly Zemanové jednoznačně doporučuji k obhajobě, kvůli zmíněným závažným nedostatkům však navrhuji známku 2-3. Pokud budou dostatečně adresované všechny tučně vyznačené otázky a připomínky v prezentaci (především grafy s chybovými úsečkami), rád se přikloním k lepšímu hodnocení.

V Úvalech 13.5.2017

RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Chmelař', written in a cursive style.

Vztah Leidenské mutace a rezistence na aktivovaný protein C

Studentka Bc. Vendula Zemanová si zvolila za téma své bakalářské práce velmi zajímavý koncept týkající se posouzení vztahu Leidenské mutace a APCR. S ohledem na skutečnost, že koagulačními metodami vyšetřená APCR často predikuje záchyt Leidenské mutace, považuji osobně téma za velmi atraktivní.

Práce v úvodní části zpracovává přehled teoretických dat čerpaných z dostupné literatury, kde shrnuje jednak informace o hemostáze obecně, v samostatné obsáhlé kapitole si pak všímá hyperkoagulace jako takové a dopodrobna popisuje vrozené trombofilní stavy. Výčet podaných informací je obsáhlý, údaje jsou logicky členěné. Autorka však občas zachází do nadbytečných detailů, které jsou samy o sobě nepochybně velmi zajímavé, ale vnímám je jako informace mimo rámec zvoleného tématu (např. informace o diagnostice akutní plicní embolizace s výčtem biomarkerů).

Ve druhé části práce se autorka věnuje vlastnímu výzkumu. Získané údaje jsou precizně rozděleny a zpracovány z různých aspektů, získaná data jsou přehledně prezentována a pro lepší názornost zpracována i ve formě grafů. Na začátku této části jsem si povšiml nerovnoměrného vyvážení v zastoupení genderu, nicméně rozumím tomu, že autorka pracovala s již daným vzorkem a nemohla si vstupní podmínky stanovit sama. Toto ovšem může ovlivnit porovnání průměrných hodnot napříč pohlavími, jako je uvedeno v grafu č.7. K mému velkému překvapení však v textu i v grafickém vyjádření zcela chybí údaje, které by prezentovaly vytčené téma práce!!, naproti tomu je množství dat porovnáním hodnot APCR a D-dimerů.

Předložený text je po obsahové stránce rozsáhlý; pro argumentaci jsou využity dostupné literární zdroje, seznam použité literatury je obsáhlý. Text je doplněn množstvím názorných schémat, přehledných tabulek a grafů, které popsanou problematiku shrnují.

Ze strany faktické by stálo nepochybně za vysvětlení, proč je uváděn F. IX za nejvýznamnější ve vnitřní cestě koagulace. Fakticky nesprávné je i tvrzení, že „Endoteliální buňka, která váže protein, se nazývá trombomodulin“. Terapeutické rozmezí INR uvedené 2,0-43,0 je, předpokládám, pouhým překlepem. To je pouze výčet některých nesrovnalostí.

Po stránce jazykové je text psán srozumitelně, ale některé z kapitol v teoretické části jsou psány až příliš hutnou formou – ačkoliv se v této problematice dokážu orientovat, místy jsem musel číst odstavce opakovaně, abych pochopil jejich smysl. Opakovaně mi v některých větách scházelo významové sloveso (např. „Toto vyšetření neumožňuje heterozygotní a homozygotní formu F V Leiden.“). Některé formulace považuji za neobratné (např. v kapitole „Hemostáza“ věta: „V tomto případě se sraženina nazývá koagulum“- neuvědomuji si jiný odborný název pro jiné případy).

Práci s přihlédnutím k všem výše uvedeným charakteristikám hodnotím jako dobrou.

Otázka k obhajobě:

Uvádíte, že rezistence na aktivovaný protein C se klinicky projevuje až v dospělosti – máte z literatury informaci, proč tomu tak je?

20.5.2017

MUDr. Pavel Hausdorf