

MUDr. Aleš Tomek předložil k obhajobě svoji doktorskou dizertační práci programu *Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie* nazvanou "Farmakogenetika warfarinu".

## Úvod

Kandidát předkládá práci na velmi aktuální téma s velkým klinickým dosahem. Přes tuto závažnost jsem jako recenzent práci dočetl se smíšenými pocity. Dizertace je založena na mezinárodních publikacích relativně nízkého dosahu, přičemž kandidát je spoluautorem několika jiných recentních sdělení na jiná témata; tato další sdělení, mohu-li soudit dle abstrakt a časopisů, kde vyšly, mají potenciálně velký klinický dopad. Předkládaná dizertační práce se mi jeví jako zakončení určité kapitoly ve výzkumné činnosti kandidáta, přičemž si nejsem zcela jist, že této dizertaci byla věnována taková pozornost, jaká bývá jinak dizertacím věnována.

## Komentář publikovaných prací

Kandidát opírá svou dizertaci o tři práce vyšlé v časopisech se známým faktorem impaktu a dále o několik prací v lokálním medicínském tisku. Zde jsou jak práce v časopise indexovaném MEDLINE (*Vnitřní lékařství*), tak práce v časopisech, které nejsou ani indexované ani nejsou v seznamu RIV "Seznam recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v České republice, aktualizovaný v roce 2013" (*Causa subita* nebo *Medicina po promoci*).

Prvé tři práce (s faktorem impaktu) a práci uveřejněnou ve *Vnitřním lékařství* jsem pozorně prostudoval, zatímco ostatní jsem nehodnotil, protože se nejedná dle RIV o časopisy s recenzním řízením - práce tak nejsou pro udělení titulu PhD relevantní.

**1. Tomek A, Maťoška V, Kolářová T et al: The bleeding risk during warfarin therapy is associated with the number of variant alleles of CYP2C9 and VKORC1 genes. *Cardiology* 2013; 125, 182-191 (impakt faktor 2012: 1,512)**

**Cíl:** zhodnotit asociaci variantních genotypů *CYP2C9* a *VKORC1* s rizikem závažných krvácení (major bleeding events) u kohorty léčené warfarinem.

**Pacienti a metody:** Byli zahrnuti pacienti tří oddělení, retrospektivní kohorta byla vytvořena v letech 2007-2012 z těch, kdo přicházeli k farmakogenetickému vyšetření na výše uvedené geny a splňovali několik definovaných kritérií - tato kritéria z 329 pacientů vydělila 194 členů kohorty. Genotypizace probíhala třemi komerčně dostupnými soupravami. Není uvedeno, který marker byl použit pro haplotyp A a B genu *VKORC1*. Statistická analýza se jeví adekvátní, použita byla Coxova regrese.

**Výsledky:** Tabulka 1 uvádí charakteristiku kohorty a univariální analýzu negenetických rozdílů. Popisuje charakter klinického outcome (krvácivé příhody) a dávku farmak při ní. V tabulce jsou genotypové frekvence dvou studovaných genů a frekvence počtu variantních polymorfismů (autoři zaměňují genotyp a haplotyp u genu *VKORC1*). Pak autoři popisují výsledky statistických modelů. V tabulce 4 uvádějí výsledky jednotlivých členů v modelech, kde byla provedena adjustace na signifikantní klinické proměnné (nestabilní dávka,

amiodaron, hluboká žilní trombóza a plicní embolie, ischemická choroba srdeční, věk nad 80 let).

Výsledky jsou podány ne zcela tradiční formou, ale jsou přehledné. Neočekávaná je absence referenčního strata, např. pacientů s 0 variantními alelami, ke kterému by bylo možné výsledky vztáhnout - takto, pokud jsem dobře pochopil, autoři vztahují např. genotyp dvou variantních alel proti jedincům, kteří jej nenesou - ale to jsou přece nejen ti, kdo mají nula nebo jeden, ale i ti, kdo mají tři variantní alely. Tak se zcela ztrácí očekávaný trend efektu. Velmi hrubé přepočítání z publikovaných dat napovídá (stejně jako pohled na Kaplan-Meierovu křivku), že efekt by mohl být signifikantní už u nositelů 2 variantních alel proti těm, kdo žádnou variantní alelu nenesou. Stejně tak by byly kvantifikovatelné rozdíly v počtu low-dose haplotypů *VKORC1*. Někdy i obyčejný test pro trend funguje překvapivě dobře.

Dalším neočekávaným faktem je absence formálního testování interakcí mezi proměnnými - zvláště pokud celkové vyznění článku předpokládá aditivní model jako nejlepší.

**Diskuse a závěry:** Jeví se přiměřené, dobře reflektují nálezy v kontextu dostupné literatury. Prozrazují dobrou orientaci v dostupné literatuře. Diskuse je velmi dobře vedena k závěru, který jasně obhajuje terapii warfarinem.

#### **Komentář:**

Článek prošel standardním recenzním řízením do časopisu se známým faktorem impaktu, není tedy třeba zvláštního komentáře v recenzi dizertace. Pouze několik otázek pro mne zůstává otevřených, vyplývají z výše uvedeného -

- a) proč si autoři nezvolili jeden genotyp jako referenční a nevztahují riziko krvácení k němu?
- b) proč nedošlo k formálnímu testování interakcí?
- c) postrádám detailnější charakteristiku, z koho vlastně byla retrospektivní kohorta vytvořena, na koho se vlastně aplikovala kritéria uvedená v Metodách. Ještě důležitější pro mne je chybějící informace o tom, jaká konkrétní kritéria vhodnosti vyřadila 41% retrospektivní kohorty z analýzy (první věta Výsledků).

## **2. Tomek A, Kolářová T, Martinková S et al: Přesnost farmakogenetických algoritmů pro výpočet denní dávky warfarinu. Cesk Slov Neurol N 2013; 76/109(5): 596-602 (IF = 0,37)**

**Úvod:** Autoři seznamují krátce s warfarinem, shrnují poznatky o genech *CYP2C9* a *VKORC1*. Následně představují možnosti řízení terapie warfarinem podle genetického nálezu v těchto dvou genech, s důrazem na modely predikce dávky farmakogenetickými algoritmy a jejich strategiemi.

**Cílem** práce bylo prezentovat genotypové frekvence výše dvou uvedených genů a porovnat přesnost a klinický přínos dostupných farmakogenetických algoritmů.

**Pacienti a metody:** Autoři uvádějí, jak je izolována DNA a jaké kity jsou použity ke genotypizaci variant *CYP2C9*\*2 a \*3 a (*VKORC1*) -1639A>G. Počáteční soubor čítal 1972 pacientů, přičemž verifikace přesnosti algoritmů se účastnila data 280 pacientů (14.2%) - nikde není uvedeno, co nejčastěji chybělo z klinických údajů ani kolik pacientů nesplňovalo kritérium stabilizace na léčbě. Autoři vybrali tři kandidátní algoritmy pro verifikaci a provedli: a) lineární regresi a výpočet  $R^2$  mezi užívanou a predikovanými dávkami; b) porovnali počet pacientů s odchylkou menší než 20% predikované dávky; zjištění přítomnosti

skutečné dávky v pásmu predikovaném pro rozmezí INR 1,7 až 3,3 s použitím publikované korekce, pokud se jedná o výpočet na jiné cílové hodnoty.

**Výsledky:** Je uvedena přehledná tabulka genotypů celé skupiny a dále podskupiny s dostupnými klinickými daty. Ta jsou shrnuta v tabulce 3 (v této souvislosti - směrodatná odchylka opravdu není vhodné vyjádření disperze dat u extrémně asymetricky rozdělených veličin, jako je zde délka terapie). Dále autoři uvádějí jako hlavní parametr porovnání korelační koeficient  $R^2$  pro dané tři modely. Uvádějí procentuálně, jaké genotypy byly předávkovány a poddávkovány (>20%) - škoda, že ne v přehlednější tabulkové formě.

**Diskuse:** Ve stručné diskusi autoři srovnávají algoritmy a dotýkají se možných důvodů rozdílů. Na závěr vyzdvihují potenciální přínos genetického vyšetření pro klinickou praxi.

#### **Komentář:**

První a nejdůležitější problém je hodnocení modelů první metodou. Korelace a regrese jsou dobré pro hodnocení vztahu dvou kontinuálních proměnných, ale po predikčním modelu chceme něco více než lineární vztah mezi predikovanou a skutečnou hodnotou. Vždyť například i model, který by systematicky a přesně predikoval pětinašobek potřebné dávky (tedy by byl klinicky smrtelně nebezpečný a zcela nepoužitelný), by měl korelační koeficient se skutečností  $R^2 = 1,00$ . Formální porovnání shody několika modelů modelu se skutečností (mimo data původního vzorku) je možné, jsou pro to dostupné metody, ale dle mého názoru je třeba angažování profesionálního statistika - ten by ve shodě s autory definoval klinicky významné meze shody (limits of agreement) a sledoval, zda se míra shody mění v rozmezí relevantních klinických prediktorů. To se zjevně nestalo a tím kvalita závěrů značně utrpěla.

Kandidát si také moc nerozumí s nomenklaturou polymorfismů. Vyšetřovaný SNP v genu *VKORC1*, rs9923231, se opravdu historicky jmenuje "-1639 G>A", jak kandidát správně uvádí v druhém příloženém článku - tam ale opomene napsat, jakého že to genu polymorfismus je. V dizertaci na straně 35 se náhle objevuje polymorfismus správného rs čísla, ale jmenuje se "1639 G>A" bez znaménka minus, které by prozrazovalo, že je to promotorová varianta. Druhá historická nomenklaturní varianta je G3673A. To je pravda, ale již se nikde neuvádí, kde se vzala a co je to za číslo (jedná se o pořadí nukleotidu v sekvenci AY587020.1 v GenBank, což se nikde v dizertaci neobjevuje, jen v příloženém článku). Také si nejsem zcela jist, kde se bere jistota, že zrovna rs9923231 je použit jako tag pro haplotyp tříd A nebo B *VKORC1* v kitu, který používá. Pokud to výrobce neudává, dalo by se to zjistit pomocí sekvenovaných kontrol nebo plazmidů s příslušným úsekem genu.

**3. Tomek A, Matoska V, Eisert C, Serebruany VL: Optimization of anticoagulation with warfarin for stroke prevention: pharmacogenetic considerations. Am J Ther. 2011 May;18(3):e55-66 (IF 2012 = 1,487).**

Z čistě formálního hlediska by bylo dobré dostat čistou verzi odpovídající tištěnému článku; v dizertaci je předložena verze, která má vnočení 2010 a nemá stránkování, patrně je to stránkový obsah ke korektuře předmětného článku. Fakticky se nicméně patrně neliší.

Jedná se o velmi dobře napsaný přehledový článek bez vlastních nových výsledků. Shrnuje dostupná data o prevenci ischemické cévní mozkové příhody pomocí warfarinu a dokumentuje, jak jeho farmakologické vlastnosti komplikují nastavení správné dávky.

Rozsáhle se věnuje tehdy dostupným datům o vlivu polymorfismů *CYP2C9* a *VKORC1*, okrajově se dotýká dalších genů.

Autor prokazuje dobrý přehled o literatuře a velmi solidní schopnost shrnutí poznatků do dostupné a velmi přehledné formy, zejména s použitím obsáhlých tabulek. Mnoho z tohoto review se pak objevuje v české verzi dizertační práce, kde je dále rozvedeno. Autor dobře argumentuje o klinicky relevantních rozdílech mezi mechanismy působení obou genů. Zmiňuje prediktivní algoritmy a velmi detailně se věnuje jejich nerandomizovanému i randomizovanému testování. Konec práce je věnován úvahám o efektivitě nákladů na genetické testování a tomu, že do doby sepsání práce nebylo snížení krvácivých komplikací při aplikaci genetického testování u této diagnózy prokázáno.

Článek je jednoznačným průkazem, že autor umí excelentně kriticky pracovat s literárními zdroji.

#### **4. Další přílohy:**

Jako příloha 4 je uveden článek "Farmakogenetické vyšetření a antikoagulační léčba warfarinem" (Medicína po promoci), v něm chybí abstrakt česky i anglicky (místo něj bílé místo). Článek neobsahuje vlastní předtím nepublikované údaje. Časopis nepatří mezi recenzované dle seznamu RIV.

Jako příloha 5 je uveden článek "Využití farmakogenetiky při léčbě warfarinem" (Vnitřní lékařství), který neobsahuje vlastní výsledky mimo grafu s frekvencemi českých pacientů podle počtu alternativních alel, jedná se o článek v kategorii "přehledný referát".

Jako příloha 6 je uveden článek "Warfarinizace po kardioembolické cévné mozkové příhodě - komentovaná kazuistika" (Causa subita), 2013, který je ve skutečnosti mezi přílohami přiložen až na posledním místě a je přiložen jako rukopis. Časopis nepatří mezi recenzované dle seznamu RIV.

Jako příloha 7 je uveden článek "Jak a proč vůbec léčit warfarinem" (Causa subita), 2012, který jsem našel po bloku abstrakt jako rukopis pod názvem "*Léčba warfarinem - má stále smysl a jak na to? ... nebo ... Jak a proč vůbec léčit warfarinem*", což - předpokládám - je nějaká pracovní verze později vyšlého článku, čemuž by napovídala nejen variantní název, ale i četné chyby v interpunkci nahodile roztroušené po rukopisu, které jsou v on-line verzi již opraveny ([http://issuu.com/causa-subita/docs/causa\\_subita\\_5\\_2012\\_final](http://issuu.com/causa-subita/docs/causa_subita_5_2012_final)). Časopis nepatří mezi recenzované dle seznamu RIV.

Dále jsou jako přílohy uvedena čtyři abstrakta, která jsou umístěna v několika stranách mezi výše uvedenými přílohami 6 až 7.

## **Komentář textu dizertační práce**

### **Úvod**

Autor zavádí pojem farmakogenetiky, udává přehled vývoje pojmu, přehled genů, které jsou pro různá farmaka vyšetřovány. Argumentuje, proč je warfarin dobrým cílem aplikace farmakogenetiky. Charakterizuje warfarin, píše o jeho historii, včetně historických osob léčených warfarinem. Vypočítává klinické indikace warfarinu a přehledně je uvádí pro naši

republiku v tabulce. Následuje stručný přehled farmakokinetických vlastností (s uvedením genu *CYP2C9*) a mechanismu účinku (kde je uveden *VKORCI*). Autor pak ukazuje nomenklaturu genů pro monooxygenázy skupiny cytochromu P450.

V tabulce 1.4.1 jsou poprvé uvedeny významné varianty genu *CYP2C9* a jejich projevy na proteinové úrovni, dále v tabulkách jsou uvedeny aktivity variant a orientačně i jejich populační frekvence, důsledky pro dávkování warfarinu a příslušné citace.

Je představen gen *VKORCI* a mechanismus blokády jeho produktu (vitamín K epoxid reduktázy) warfarinem. Zmíněny jsou vzácné bodové mutace. Dále se text zabývá běžnými polymorfismy genu: poněkud problematický je výše uvedený zmatek autora v názvosloví těchto variant, naštěstí jsou uváděna rs čísla, čili se lze v polymorfismech vyznat. Dalším názvoslovným zmatkem je záměna pojmu haplotyp a genotyp v posledním odstavci strany 35 a odsud dále po celou dizertaci. V obrázku 1.5.1 (popisek na str. 36, zbytek na straně 37) není jasné, který SNP je podle Riedera na pozici 6853 (jaké referenční sekvence?) - tím chybí informace, co je pro dichotomizaci stromu haplotypů v daném článku tím nejdůležitějším určovatelem.

Další odstavce se zabývají geny s menším efektem na potřebnou dávku warfarinu a velmi přesvědčivě argumentují proti jejich rutinnímu vyšetřování. Jedna sekce je věnována negenetickým faktorům ovlivňujícím dávku warfarinu a jejich dělení podle objektivní kvantifikovatelnosti. Následuje přehled interakcí s léčivou, včetně literárních údajů o diference v indukovatelnosti jednotlivých variant *CYP2C9*.

Autor se tím dostává ke klinickému využití genetické informace: zmiňuje dostupné poznatky o vztahu dávky ke genotypu a osvětluje, k čemu se dají genetická vyšetření použít. Zmiňuje odlišné strategie výpočtu dávky před nasazením versus korekce dávky podle prvních výsledků INR. Autor prokazuje velmi dobrou znalost literatury o dostupných studiích. V tabulce 1.9.2 na straně 48 a 49 je relativně velmi detailní přehled dostupných studií (proč je v posledním sloupečku uvedena každá citace dvakrát?).

Zvláštní pozornost je věnována detailnímu rozboru důležitých studií CoumaGen-II, EU-PACT a COAG, kde je patrný hluboký zájem a fundované kritické uvažování kandidáta.

Na závěr literárního přehledu uvádí kandidát dostupné údaje o odhadu rizika krvácení během léčby warfarinem (tabulka 1.9.3), kterému se pak věnuje v první publikaci v příloze. V tabulce by bylo vhodné uvést citace ve standardním formátu a sjednotit obsah sloupečků mezi jednotlivými studiemi (např. sloupeček Průměrná doba sledování uvádí někdy tuto dobu, jindy i celkovou dobu všeho sledování, jednou dokonce i počet krvácení).

### **Cíle**

Cílem bylo zavést a ověřit klinickou využitelnost farmakogenetiky v léčbě warfarinem a) selekcí nejvýhodnějšího algoritmu predikce dávky, b) tvorbou vlastního algoritmu, c) zjištění závislosti výskytu krvácivých komplikací na genotypu.

Cíle jsou stanoveny jasně a přehledně, jakkoli se do cílů už částečně vmísil popis skupin pacientů.

## **Metodika**

Kapitola začíná velmi krátkou a nedostatečně informativní sekcí o souborech pacientů. Dočteme se o čtyřech skupinách, které se "částečně překrývají". Není jasné, jak byly skupiny vytvořeny. Pro skupinu 3 a 4 si lze pro tuto informaci dojít do článku v příloze 1, pro skupinu 1 a 2 do přílohy 2, nicméně hlavní informace chybí: jaké faktory rozhodovaly o tom, zda budou klinická data natolik kompletní, aby pacient ze "své" skupiny nevypadl? Není kompletnost dat nějak spojena s některou ze sledovaných veličin - nevznáší se tam takto nějaké závažné zkreslení? Na takovou otázku nikdo neodpovídá ani v dizertaci, ani v publikovaných článcích. Je-li "odpad" neúplných dat 41% (článek v první příloze), nebo dokonce 86% (druhý článek), něco není v pořádku buďto s iniciální příliš širokou definicí souboru nebo se vstupními kritérii.

Genotypizační metody jsou standardní. Jedná se o tři kity prodávané firmou Idaho Technology, plus jejich master mix. Práce téměř mlčí o vlastním provádění genetického testování; lze jistě předpokládat, že zvolená metodika spolehlivě funguje. Autor uvádí, že HRM analýza byla vybrána z ekonomických důvodů - mně se po letném přečtení diplomové práce Mgr. Mlčochové (která se vývojem zabývala v rámci zmiňovaného grantu FR-TI 1/399 firmě GeneProof) spíše zdálo, že vývoj probíhal značně ztuha a zakoupení již hotového kitu bylo rozumnou alternativou vlastního vývoje. Jakkoli u *CYP2C9* je genotypizační strategie předvídatelná, u *VKORC1* bych velmi uvítal informaci o tom, na základě jakého/jakých jednonukleotidových polymorfismů je haplotyp stanoven. Pokud je to jen jeden polymorfismus a nemáme data z české populace, pak by autor možná mohl dále hovořit nikoli o haplotypech A a B, ale právě o genotypu jednoho konkrétního polymorfismu.

Autor nezmiňuje, zda a jak byla prováděna vnitřní a externí kontrola genotypizace.

Metoda porovnávání publikovaných algoritmů pomocí korelačního koeficientu je podle mého názoru nesprávná (více ve stanovisku k druhému publikovanému článku). Bylo by také vhodné, aby autor specifikoval více o porovnání pacientů s odchylkou dávky skutečné a predikované menší či větší než 20% užívané dávky - nejsem si na první pohled z popisu schopen představit použití McNemarova testu, což samozřejmě nemusí nijak znamenat, že by jeho použití nebylo správně.

Algoritmus budování lineárního predikčního modelu i budování Coxova modelu se jeví jako adekvátní a standardní, s výjimkou absence testování interakčních členů. Nelze mi nezmínit výjimečně vysoký počet chyb (čárky, shody) na straně 68.

V sekci 3.3.2 autor jaksi odděleně znovu charakterizuje pacienty a cíle pro podstudii o krvácivých komplikacích (publikace v příloze 1), přičemž z textu by mohlo být jasnější, jak je studie postavena. Z publikace jsem získal dojem, že se jednalo o retrospektivní kohortu, zde najednou však se bez další bližší informace píše o dvou kohortách, "skupina 3" a "skupina 4".

## **Výsledky**

Výsledky začínají přehledem genotypových frekvencí *CYP2C9* a *VKORC1* u všech 1972 pacientů a u podskupiny 280 pacientů s klinickými daty. Tabulky jsou přehledné. Další sekce se zabývá srovnáním předpovězených a skutečných dávek warfarinu podle tří algoritmů - to bylo podkladem pro publikaci v příloze 2.

Následují výsledky tvorby vlastního farmakogenetického algoritmu. Zde se již ztrácím v tom, kteří pacienti (jak vybraní a kde se vzali) byli součástí tohoto procesu. Počet pacientů s

dostupnými klinickými daty (280) je totiž nižší než počet v derivační plus validační kohortě:  $175 + 223 = 398$ . To by zasloužilo nějaké osvětlení nejlépe formou diagramu.

Překvapivá je také strategie tvorby modelu na souboru omezeného věkového rozmezí a jeho validace na souboru, který obsahuje velmi široké věkové rozmezí (obr. 4.3.1 - záporné hodnoty na ose y jsou zbytečné). V derivační skupině prostě není velmi podstatná část věkového složení vůbec zastoupena a je není tak divu, že ve výsledcích z validační kohorty dopadá tato skupina nejhůře. Nebylo by bývalo lepší vzít skupinu jednu a validitu modelu testovat pomocí bootstrappingu?

Není zmíněno, proč je závislá proměnná transformovaná (odmocnina). Je to určitě v pořádku, protože to také tak používají některé z citovaných článků, ale informace o důvodu chybí.

Škoda, že dizertace neprezentuje vypočtenou versus skutečnou dávku v grafu, aby si čtenář mohl udělat vizuální představu o tom, jak se algoritmus chová - třeba podobně, jako je prezentováno na obrázku 4.3.7 pro srovnání dvou metod predikce.

V další sekci jsou uvedeny výsledky studie rizik závažného krvácení, která je podkladem článku v příloze 1. Ta je komentována výše.

Tabulka 4.4.3: "Rozdíl mezi skupinou s krvácením a kontrolní skupinou" - to je patrně P hodnota testu rozdílu, že? Stejně tak druhý sloupeček s P hodnotami. Dále - frekvence genotypů: takto testovat efekt genotypů není příliš obvyklé. Obvyklejší bývá zvolit jeden genotyp jako referenční (má tedy  $OR/HR = 1$ ) a riziko přinášené ostatními vyjadřovat vůči němu. Jak jsou kódovány genotypy VKORC1 v modelu?

Další problém je s poněkud nepřesným vnímáním statistické signifikance. Formulace "nalezli ... jsme jen nevýznamně vyšší zastoupení variantních alel" nemusí být vnímána správně. Zastoupení vyšší nebylo, pokud nebylo signifikantně vyšší. Nepřítomnost signifikantního rozdílu znamená, že nulová hypotéza *absence rozdílu* nemůže být *zamítnuta* - buď proto, že rozdíl neexistuje, nebo proto, že vzorek je malý.

Stejně tak tabulka 4.4.4 uvádí částečné výsledky univariální analýzy, přičemž vybírá ty výsledky, kde je odhad  $HR > 1$ , nicméně většinou nesignifikantně. Správnější by bylo buďto prezentovat *všechny* prediktory nebo jen ty, co jsou vyšší než 1 *signifikantně*. Kde se ztratily prediktory, které měly odhad HR i jen trochu menší než 1?

## **Diskuse**

Diskuse se nejprve zabývá přesností predikčních algoritmů (obdobně jako v článku v příloze 2) a vlastním algoritmem. Kde je tabulka číslo 5 avizovaná na straně 104?

Posléze se diskuse věnuje výsledkům studie v příloze 1 (krvácivé komplikace). Shrnuje výsledky práce. "Dále jsme prokázali závislost genotypu v obou genech *CYP2C9* a *VKORC1* na snižující se denní dávce warfarinu a narůstajícím riziku závažných krvácivých komplikací ..." - co tímto chce autor říci o kauzalitě? Text dále srovnává výskyty krvácení v čase v této a ostatních studiích a zabývá se možnými mechanismy vysvětlujícími pozorovaný efekt.

Na dalších sedmi stranách se zabývá srovnáním warfarinu s novými antikoagulanty za předpokladu správné aplikace farmakogenetiky warfarinu v léčbě. Shrnuje dostupné studie a argumentuje ve prospěch warfarinu, jehož aplikace je řízena farmakogenetickými nálezy. K

zhodnocení těchto úvah by bylo třeba odborného statistického posudku s použitím originálních dat. Zdá se mi, že v myšlenkovém experimentu se skupinou studie RE-LY, na kterou by se aplikovala farmakogenetická pravidla, je logická nepřesnost. Pacienti se 3 nebo 4 variantními alelami sice tvoří v české studii 20% krvácení na warfarinu, ale to není zde až tak důležité, jak autor uvádí. To, kolik ze všech krvácení mají právě tito pacienti, totiž závisí na a) proporci genotypů v populaci: existuje rozumný předpoklad, že byla shodná jako v naší populaci?, b) na čase: Re-LY sledovala pacienty po dobu jednoho roku, jak je to v datech, která uvádějí oněch 20%?

Lepší by bylo sledovat incidenci krvácení u jednotlivých genotypů nebo přežití do krvácení, což je patrně jako myšlenkový experiment při absenci detailních dat nemožné. Mimo to není snadné se v tabulkách s výsledky těchto myšlenkových experimentů orientovat, zejména se lze snadno ztratit v tabulce 5.4.4 a 5.4.5, kde není jasný směr měřeného rizika. Také jsem se docela ztratil v tom, jak jsou kteří pacienti analyzováni - *per protocol* znamená, že jsou analyzováni jen ti, kdo byli zařazeni, dostali intervenci a skončili podle protokolu (tedy beze změn), kdežto *as treated* znamená analýzu podle skutečně obdržené intervence (i když byla důsledkem změny proti protokolu).

Závěr práce shrnuje krátce hlavní teze diskuse.

#### **Formální náležitosti dizertační práce:**

**Dizertační práce utrpěla buďto nedostatkem času nebo nedostatkem pozornosti.** Je dlouhá - kdyby měla poloviční rozsah, ale byla jí věnována dvojnásobná péče, četla by se rozhodně lépe.

- Nedělá dobrý dojem, když u jedné z příloh je bílé místo tam, kde má být souhrn a klíčová slova. Každému se někdy stalo, že z elektronické verze se něco nevytisklo, ale málokdo to nechal bez další kontroly svázat do dizertační práce.
- Příloze 2 ani 3 by neuškodilo, kdyby se jednalo o finální verzi a nikoli stránkový obsah bez číslování. Přece jen uběhlo již hodně času od publikace.
- Obdobně by se hodilo, kdyby poslední dvě přílohy nebyly rukopisem (články z roku 2012 a 2013), ale jednalo se o vytištěné články - to se autor nezajímal o to, jak vypadají vytištěné? Navíc pořadí příloh neodpovídá seznamu a jedna z příloh se dokonce jinak i jmenuje - přiložena je patrně verze, kde ještě není rozhodnuto o názvu.
- Množství překlepů a pravopisných chyb je závažnější. Problémy dělají zejména oddělování vložených vedlejších vět čárkami z obou stran; odhadem se jedná o cca 50 případů jen špatné interpunkce.

#### **Další otázky pro kandidáta:**

Mimo otázek uvedených výše v textu (zvýrazněno šedě) bych rád položil následující otázky:

1. Jak jsou definovány pojmy *vazba* a *vazbová nerovnováha*? Mezi čím jsou to vztahy, čeho jsou důsledkem, jak se vyjadřují (měří), k čemu se v genetice používají? Kdy a proč vzniká haplotyp? Jak lze haplotyp rekonstruovat z genotypů? Znáte nějaký způsob, jak haplotypy vizualizovat?
2. Jaké jsou argumenty pro korelační koeficient jako vhodné měřítko shody různých predikčních modelů se skutečnou dávkou warfarinu? Dle mého názoru bude  $R^2=1$  i tehdy, bude-li predikční model systematicky navrhopvat dávku warfarinu přesně poloviční (nebo třeba přesně pětinašobnou) proti dávce skutečné. Korelační koeficient



je ve skutečnosti velmi nevhodným měřítkem shody - zjednodušeně měří jen souhrnnou vzdálenost bodů od přímky, lineárnost vztahu, ale je mu lhostejno, zda je přímka správně položena. Jak se dá klinicky relevantní shoda metod měřit jinak?

3. Definoval byste prosím pojem kohorty? Pojem je dle mého názoru používán nesprávně minimálně u pacientů s krvácivými projevy a jejich kontrolami.
4. V prvním článku zmiňujete, že používáte zavedené vnitřní a vnější kontroly kvality genotypizace. Jaké to jsou?
5. Proč nejsou výsledky tvorby vlastního farmakogenetického algoritmu publikovány?

## Souhrn stanoviska oponenta:

Jakkoli je předkládaná dizertační práce cenná klinicky, není snadné hodnotit, zda splňuje nároky postgraduálního studia v biomedicině, programu *Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie*. Formální kritéria - počet publikací v časopisech s faktorem impaktu - splňuje, ačkoli z příložených publikací se mi jeví jako opravdu hodnotné jen dvě - v příloze 1 a v příloze 3. **Včasná konzultace s odborníky ve farmakogenetice, epidemiologii a statistice by patrně umožnila získání přesvědčivějších výsledků a vedla by k lepším publikačním výstupům a snadnější obhajobě.**

Práce obsahuje z laboratorních prací jen použití tří komerčně dostupných souprav k typizaci jednonukleotidových polymorfismů, přičemž se autor v minimálně jednom případě (*VKORC1*) nikterak nezabývá tím, co vlastně souprava detekuje. Aplikace již existujících metod není v molekulární epidemiologii ani aplikované farmakogenetice nijak na závadu - v případech takovýchto dizertací jsou cenné zejména systematický sběr dat, jejich uvážlivé hodnocení pomocí adekvátních statistických metod a následné publikace v respektovaných časopisech.

**Dizertace je z formálního hlediska podprůměrná.** Je v ní dosti pravopisných chyb a přílohy nebyly patrně řádně zkontrolovány. Je příliš dlouhá a autor opakuje rozvlekle mnoho z toho, co již předtím napsal - mimochodem většinou velmi jasně a přehledně - v příložených publikacích.

**Publikační aktivita spojená s touto dizertací je nižší, než bývá v oboru zvykem, ale vypsaná kritéria jednoznačně splňuje.** Původní prvoautorský mezinárodní článek k tématu práce je jeden (příloha 1). Další (příloha 3) je excelentně napsaný přehledový článek. Další článek (příloha 2) má jak vlastní výsledky, tak faktor impaktu (jakkoli je velmi nízký), ale je česky, čili se nedá očekávat jeho rozšíření do mezinárodní vědecké komunity. Nový model predikce dávky warfarinu nemohu najít jinde než přímo v dizertaci, což je škoda s ohledem na vynaložený čas a prostředky.

Jsem toho názoru, že **práce nároky na udělení titulu Ph.D. splňuje.**

19.5.2014

Doc. MUDr. Ondřej Cinek, Ph.D.