

**Oponentský posudek doktorské dizertační práce MUDr. Ivana Šubrt a ve vědním oboru Gynekologie a porodnictví na téma „Význam trombofilních a imunologických faktorů v lidské reprodukci“.**

**Identifikační údaje**

Jméno autora: MUDr. Ivan Šubrt

Pracoviště: Ústav lékařské genetiky LF UK a FN  
E. Beneše 13  
305 99 Plzeň

Název práce: Význam trombofilních a imunologických faktorů  
v lidské reprodukci

**Rozsah práce a dokumentace**

81 stran, 11 tabulek, 13 obrázků a grafů, 127 literárních odkazů, 4 publikace autora související s tématem, 4 přednášky autora související s tématem, jiné publikace 11, jiná přednášková činnost 20, 3 přílohy (z nich 2 články v časopisu s IF, kde je kandidát autorem prvním. American Journal of Reproductive immunology IF (3,317).

**Téma práce, statistické zpracování výsledků, grafická a tabelární prezentace**

Cílem studie bylo stanovit frekvence osmi antifosfolipidových protilátek (fosfatidyl-L-serin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidyl-DL-glycerol, kyselina fosfatidová, annexin V, kardiolipin, beta2-GPI) a vybraných genetických trombofilních faktorů a jejich vzájemný vztah u pacientek s opakovanými těhotenskými ztrátami a u kontrolního souboru zdravých žen.

V práci byly zvoleny vhodné metody stanovení protilátek a trombofilních mutací. K detekci antifosfolipidových protilátek byla využita metoda ELISA. Trombofilní mutace faktoru V Leiden (F5 G1691A), F II G2210A a varianty MTHFR C677T a MTHFR A1298C byly stanoveny metodou analýzy křivky tání PCR produktu na podkladě rezonančního přenosu fluorescenční energie (FRET). K detekci variant PAI1(-675)4G/5G, PROZ intron F G79 A(-13)G a PROZ R255H byla zvolena standardní metoda PCR-RFLP.

Ze získaných dat byla vykalkulována distribuce genotypů a alelické frekvence jednotlivých variant. Shodu sledovaného souboru a kontrol a vztah mezi přítomností antifosfolipidových a potenciálních trombofilních faktorů byla testována chí-kvadrát testem a Fisherovým exaktním testem.

Práce je vyvážená a je dobře strukturována. Po stručném úvodu a vytyčení cíle práce autor v oddílu „Současný stav poznání“ definuje pojmy sterility, časných a pozdních těhotenských a fetálních ztrát a stručně se zabývá jejich příčinami (chromozomální, anatomické, endokrinologické, imunologické a imunogenetické, infekční, aj.), definuje antifosfolipidový syndrom, dědičné trombofilie jako příčinu opakovaných těhotenských ztrát (recurrent pregnancy loss, RPL) a krátce se zabývá budoucími směry genetických příčin RPL, výsledky práce jsou potom doplněny krátkou diskuzí a závěrem.

### Závěry

1. Porovnání výskytu antifosfolipidových protilátek a sledovaných trombofilních mutací u sledovaného souboru a zdravých kontrol.

Bylo prokázáno statisticky významné zvýšení hladin plazmatické protilátky proti fosfatidyl-L-serinu ve třídě IgG ( $<0,01$ ).

Bylo prokázáno statisticky významné zvýšení hladin plazmatické protilátky proti fosfatidylinositolu ve třídě IgG ( $p<0,01$ ).

Nebyly prokázány změny v alelických frekvencích a distribuci genotypů vyšetřovaných klasických trombofilních mutací.

Byla prokázána vysoce pozitivní korelace mezi klasickým geneticky podmíněným trombofilním stavem a pozitivními hladinami antifosfolipidových protilátek ve skupině se 3-8 RPL ( $p < 0,01$ ).

2. Zhodnocení korelace současného výskytu antifosfolipidových protilátek trombofilních mutací u sledovaného souboru.

Bylo prokázáno statisticky vysoce významné zvýšení frekvence homozygotního genotypu 4G/4G polymorfismu PAI1(-675)4G/5G ( $p < 0,0005$ ).

Nebyla prokázána korelace mezi distribucí homozygotního genotypu 4G/4G polymorfismu PAI1(-675)4G/5G a pozitivními hladinami antifosfolipidových protilátek.

Nebyly prokázány změny v alelických frekvencích a distribuci genotypů vyšetřovacích mutací genu PROZ.

Nebyl prokázán vztah mezi přítomností mutace PROZ R255H v heterozygotním nebo homozygotním stavu a pozitivními hladinami antifosfolipidových protilátek.

3. Publikace výsledků v impaktovaném periodiku.

Subrt I, Ulcova-Gallova Z, Cerna M, Hejnalova M, Slovanova J, Bibkova K, Micanova Z. Recurrent pregnancy loss, plasminogen activator inhibitor-1 (-675) 4G/5G polymorphism and antiphospholipid antibodies in Czech women. Am J Reprod Immunol. 2013;70(1):54-58.

Subrt I, Ulcova-Gallova Z, Bibkova K, Micanova Z, Hejnalova M, Cerna M, Hradecky L, Novotny Z. Recurrent pregnancy loss and frequency of eight antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in Czech women. Am J Reprod Immunol. 2008, 59(3); 193-200.

Autor udává (str.60), že mu není známa žádná dosud publikovaná studie, která by se zabývala vzájemným vztahem antifosfolipidových protilátek a trombofilních mutací u pacientek s RPL. Dosud publikované studie zabývající se rolí antifosfolipidových

protilátek a genetických trombofilií zkoumaly každý z uvedených rizikových faktorů odděleně. Tato skutečnost je z hlediska vývoje poznání velice významná.

Výsledky výzkumu mají též praktický význam v doporučení vyšetření rozšířeného panelu antifosfolipidových protilátek v rámci specializované péče o ženy s opakovanými časnými těhotenskými ztrátami.

Výsledky studie naopak nepotvrzují vhodnost rutinního genetického testování klasických trombotických mutací.

Testování přítomnosti homozygotního genotypu PAI1(-675)4G/4G by podle autora mohlo být využito v rámci komplexní péče o ženy s opakovanými časnými těhotenskými ztrátami ve specializovaných centrech.

### **Zpracování tématu s ohledem na dosavadní stav dané problematiky**

Práce je tématicky aktuální. Postupy, metodika a statistické zpracování jsou voleny vhodně.

Zpracování grafů a tabulek má vysokou formální úroveň.

Vhodná je volba a provedení statistického zpracování výsledků, provedená ve spolupráci se statistikem-profesionálem.

V práci je dobře volena terminologie, je psána dobrou češtinou, autor se vyjadřuje přesně.

Literární odkazy jsou recentní, čerpající z domácích a zahraničních pramenů, jsou v přiměřeném počtu.

Stanoviško, vycházející z předchozího stanoviska a celkové hodnotící práce

### **Připomínky**

Podle ustanovení § 47 Zákona o vysokých školách a o podmínkách akreditace a řízení vysokých škol (č. 119/2012 Sb.) příslušnými orgány k daným otázkám.

### **Připomínky formální**

1. Tema je aktuální.

Práce má vysokou formální úroveň, tabulky jsou přehledné, drobné jazykové nedostatky mají charakter překlepů. Literatura není zpracována podle Vancouverské klasifikace.

3. Práce přinesla nové poznatky v oblasti gynekologie a porodní asistenci v oboru medicíny.

### **Připomínky faktické**

4. Dizertace splnila stanovený cíl. Autor zodpověděl otázky, který si položí a výsledky publikoval v časopise s IF.

### **Dotazy k autorovi**

Předložena práce splňuje podmínky stanovené v § 47 Zákona o vysokých školách a o podmínkách akreditace a řízení vysokých škol (č. 119/2012 Sb.)

Na co by se autor jako genetik zaměřil v případě, že pacientka je pozitivní v trombofilních faktorech (např. Leidenská mutace) a současně má prokázaný antifosfolipidový syndrom a při léčbě obou těchto příčin tří předešlých spontánních abortů přesto opět potratí?

V kterých indikacích by měla být prenatální diagnostika hrazená pojišťovnou (tj. ekonomicky dostupná)?

V Praze, dne 27. listopadu 2013

Doc. MUDr. Jitka Křížová

1 LF Ústí nad Labem v Praze

Apodobařka 10

138 01 Praha 1

## Stanovisko, vycházející z předchozího rozboru a celkové hodnocení práce


Podle ustanovení § 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb. přikládám vyjádření k daným otázkám.

1. Téma je aktuální.
2. Postupy a metodika jsou voleny vhodně, na úrovni současných poznatků (výběr souboru, měření, statistické zpracování).
3. Práce přinesla nové poznatky, v oblasti gynekologie a porodnictví, reprodukční medicíny.
4. Dizertace splnila stanovený cíl. Autor zodpověděl otázky, které si položil a výsledky publikoval v časopise s IF.

### Závěr

Předložená práce splňuje podmínky stanovené v § 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb. proto na jeho základě **doporučuji** udělit MUDr. Ivanovi Šubrtovi akademický titul doktor ve zkratce **Ph.D.**

V Praze, dne 27. listopadu 2013

  
Doc. MUDr. David Kužel, CSc  
1.LF UK a VFN v Praze  
Apolinářská 18  
128 51 Praha 2