

Oponentský posudek disertační práce MUDr. Zuzany Heřmanové
Imunologické laboratorní testy u systémových autoimunitních onemocnění

Posuzovaná disertační práce MUDr. Zuzany Heřmanové, je ukázkovou prací, která dokumentuje, jak na základě výsledků dosažených aplikací jak standardních, možno říci klasických, tak nově zaváděných laboratorních metod v rutinní klinické imunologické laboratoři mohou být a jsou ověřovány a korigovány výsledky základního výzkumu. Je totiž všeobecně známo, že výsledky získané na experimentálních modelech nemusí a také často nekorelují s výsledky získávanými v klinické praxi.

Dr. Heřmanová ve své práci sumarizuje a hodnotí výsledky získané se svým kolektivem v laboratořích Ústavu imunologie LF Olomouc v sérologické diagnostice revmatoidní artritidy (RA) a systémového lupusu erytematodes (SLE) jako příkladů systémových autoimunitních onemocnění. Cílem práce bylo posouzení výpovědní hodnoty vybraných laboratorních metod u těchto chorob. Data byla získávána během poměrně dlouhého období několika let, kdy se postupně zaváděly nové laboratorní metody pro diagnostiku a monitorování těchto chorob a k jejich ověřování tak byly používány různé soubory pacientů. Proto, i z těchto důvodů, je výsledková část rozdělena do několika samostatných kapitol. Závěrečné shrnutí dokumentuje, že vytýčeného cíle bylo dosaženo.

Autorka správně upozorňuje, že výsledky její práce a analogických prací, které jsou založeny na sérologických metodách, mohou být relevantně interpretovány jen v kontextu s výsledky metod buněčné imunologie a genetické analýzy.

Nepřekvapuje, že výsledky stanovení anti-CCP a anti-MCV spolu statisticky velmi dobře korelují. Citrulinace, resp. deiminace argininu v molekulách peptidů a proteinů, je totiž obecný mechanismus, který má svůj biologický význam a autorka snad mohla pouze zdůraznit, že jeho rozsah u RA je natolik vysoký, že dovoluje použít tyto testy jako „specifické“ sérologické testy pro diagnostiku RA.

Stanovování analytu a zároveň protilátek proti tomuto analytu v jednom vzorku je z analytického hlediska velký problém. Proto jsou i výsledky dosažené při stanovování C1q a anti-C1q ve vzorcích sér u pacientů s SLE cenným podkladem pro laboratoře a klinická pracoviště, která tyto analýzy aplikují.

Práce obsahuje řadu také cenné informace o dalších analytech, které sice nejsou pro RA a SLE specifické, dovolují však monitorovat aktivitu zánětlivého procesu provázejícího toto onemocnění (MMP-3, C1q, C3, C4, trombomodulin, neopterin, sCD30, sCD40L). Tyto informace dovolují racionalizovat a zefektivňovat laboratorní vyšetření používaná k diagnostice RA a SLE.

Zvláštní pozornost si zasluhují testy na stanovování protilátek proti ds-DNA a nukleozómům. Tyto testy bývají dosud stále považovány většinou za testy více méně specifické pro SLE, které mohou sloužit také pro monitorování aktivity onemocnění, jak uvádí rovněž autorka v úvodní teoretické části práce (str. 20 – 32). Je tomu ale v praxi skutečně tak? Výsledky její práce tato konstatování již tak jednoznačně nepodporují. Překvapivé je zjištění, pokud se jedná o srovnání ELISA testů pro tyto analyty, že „Výrazná část anti-dsDNA

negativních sér ukázala pozitivitu antinukleosomálních protilátek, ale ne naopak.“ (str. 54). Obvykle tomu bývá naopak. Všeobecně se ví, že pro SLE je vysoce specifický fluorescenční test na citidíích, ale že je málo citlivý. Naopak ELISA testy pro stanovení anti-dsDNA bývají vysoce citlivé, ale pro SLE málo specifické. Jistě závisí také na tom, jaké konkrétní antigeny byly u metod používaných autorkou v testech použity. U obou testů jde o to, jak čisté antigeny byly použity ke coutování destiček, což jsou, bohužel, u komerčních souprav nedostupné údaje. U dsDNA je specifičnost testů tím menší a senzitivita testů tím větší, čím čistší dsDNA byla použita jako zdrojový antigen, u nukleozómů je tomu právě naopak. A mohou být tyto protilátky a obecně jakékoliv protilátky proti vnitřním strukturám intaktních buněk, patogenní, nemoc vyvolávající, pro libovolná onemocnění včetně SLE a nebo jsou jen protilátkami asociovanými s těmito onemocněními? To jsou provokativní otázky, které atakují mnohá zažitá paradigmat, ale začínají se dnes stále častěji objevovat. I když je autorka, pro mne pochopitelně, ve své práci neotvírá a na základě svých výsledků na ně ani nemůže jednoznačně odpovědět, zajímal by mne její názor.

Práce je vypracována velmi pečlivě, obsahuje rozsáhlý teoretický úvod, dobře se v ní orientuje, výsledky jsou dokumentovány srozumitelně při aplikaci vhodných statistických metod. Seznam použité literatury obsahuje 121 citací. Autorka výsledky své práce prezentovala na 18 konferencích a seminářích v rámci ČR, jsou součástí 39 abstrakt a 20 publikací v tuzemských i zahraničních časopisech. Přesto bych si dovolil několik drobných připomínek. Je dobré, když definujeme vždy pečlivě pojmy a termíny, s nimiž operujeme. Vyhňeme se tím pak mnohým možným následným nedorozuměním a polemikám.

Např. již v Obsahu (kap. 3.1.) autorka uvádí „stanovení anticitrulinových protilátek“ a myslí tím anti-CCP, což objasňuje na str. 20. Nejde totiž o stanovení protilátek proti citrulinu, ale proti arteficiálním cyklickým citrulinovaným peptidům, jak také vyplývá dále z textu.

V úvodní, teoretické části bych přivítal podrobnější a častější odkazy na literaturu, která je bezesporu dostatečná. Skutečnému zájemci o probíranou problematiku to pak usnadňuje další studium.

Jak je v české literatuře běžné, autorka běžně používá termín „hladina“, který je překladem anglického slova „level“. Není to šťastné, neboť někdy může znamenat termín hladina koncentraci, někdy aktivitu (např. str. 26 nízké hladiny komplementu C3, C4, CH50). Pro zasvěcené v tomto případě není problém, ale někdy skutečně nelze rozlišit, zda šlo autorovi a vyjádření koncentrace nebo aktivity, např. enzymu. A to může být podstatný rozdíl.

U anti-Ro/SSA by bylo vhodné upřesnit, že jde, předpokládám, o antigen Ro62, i když je tento fakt dnes přijímán téměř automaticky.

Závěrem mohu konstatovat, že předloženou disertační práci doporučuji k obhajobě a aby byl autorce na základě úspěšné obhajoby udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D., dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Oponentský posudek disertační práce „Imunologické laboratorní testy u systémových autoimunitních onemocnění“

Studijní Obor: Lékařská imunologie
Autorka: MUDr. Zuzana Heřmanová
Školitel: Prof. MUDr. Pavel Horák, CSc.

Ústav imunologie
Lékařská Fakulta
Univerzita Palackého Olomouc

Disertační práce MUDr. Zuzany Heřmanové se zabývá problematikou imunologických laboratorních vyšetřovacích metod u vybraných systémových autoimunitních revmatických onemocnění.

Struktura disertační práce je založena na teoretickém úvodu a dokumentované vlastní výzkumné práci. Vlastní text disertační práce čítá 61 stran, 12 tabulek, 7 grafů a jeden obrázek. Autorka uvádí k vlastnímu textu disertační práce celkem 121 citací. Text disertační práce je přehledný, má zvyklé členění na teoretický úvod, definici cílů práce, výsledky, závěrečné shrnutí, použité zkratky, citovanou literaturu, seznamy publikační aktivity. Seznam publikační aktivity je úctyhodný, zahrnuje 18 vlastních přednášek a dále autorství nebo spoluautorství 39 abstraktů a 20 publikací in extenso publikovaných nejen v českých ale i zahraničních odborných periodických, včetně impaktovaných.

V úvodu práce podává autorka přehled současného stavu studované problematiky. V této části se zabývá obecnými poznatky o fungování imunitního systému, zaměřuje se na neadekvátní reakce imunitního systému, zejména na autoimunitu, rozebírá základní mechanismy autoimunitní reakce. V dalších kapitolách teoretického úvodu se zaměřuje na autoimunitní onemocnění a jejich etiologii a následně obrací svoji pozornost na dvě vybraná systémová autoimunitní revmatická onemocnění revmatoidní artritidu a systémový lupus erythematoses. Zabývá se patogenezí, klinickým obrazem a laboratorní diagnostikou těchto vybraných onemocnění.

V další části disertační práce autorka definuje cíle práce. Obecným cílem práce bylo posouzení výpovědní hodnoty vybraných laboratorních metod u revmatoidní artritidy a systémového lupus erythematoses.

Výsledky disertační práce byly rozděleny do několika okruhů:

1. Posouzení přínosu stanovení protilátek proti cyklickému citrulinovanému peptidu u pacientů s RA pro stratifikaci nemocných vyžadujících intenzivnější léčbu. Práce potvrdila výbornou výpovědní hodnotu stanovení anti-CCP protilátek pro diagnostiku RA. Vyšetřovaný soubor zahrnoval celkem 1023 vyšetřených sér od 577 pacientů nejen s RA, ale i osteoartrózou, s jinými systémovými chorobami pojiva, ankylozující spondylitidou, osteoporózou a jinými revmatickými chorobami. Stanovení sérové hladiny anti-CCP protilátek dosahovalo v daném souboru 78,7% senzitivitu a 97,6% specificitu pro RA.
2. Posouzení přínosu stanovení protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu (anti-MCV) u pacientů s aktivní RA. Stanovení anti-MCV protilátky bylo provedeno na menším souboru pacientů, který zahrnoval 44 pacientů s RA, 6 pacientů s osteoartrózou, 6 pacientů s jiným systémovým onemocněním pojiva, 4

s nediferencovanou artritidou, 2 s laboratorním autoimunitním syndromem a 11 s ostatními revmatologickými diagnózami. Senzitivita tohoto testu byla v souboru pacientů s RA 84,1 % a specificita 96,6 %. Stanovení této autoprotilátky může doplňovat laboratorní diagnostiku RA. V sledovaném souboru pacientů s RA kopírovalo přítomnost anti-CCP protilátek.

3. Posouzení stanovení sérové hladiny matrixové metaloproteinázy 3 v kontextu ostatních parametrů RA pro identifikaci pacientů ve vyšším riziku vývoje destruktivního onemocnění. Hodnocený soubor tvořilo 92 pacientů s RA, 24 pacientů s jinou revmatologickou diagnózou a 26 zdravých jedinců. Autorka prokázala signifikantní zvýšení sérových hladin MMP-3 u pacientů s RA proti ostatním dvěma kontrolním souborům. Hladiny MMP-3 byly rovněž signifikantně vyšší v souboru non-RA pacientů ve srovnání se souborem zdravých jedinců. Hladina MMP-3 pozitivně korelovala s vybranými parametry RA skóre DAS28, hladinou CRP, FW, anti-CCP a RTG nálezem. Vyšetření hladin MMP-3 se v kontextu dosavadních poznatků jeví jako slibný prognostický marker RA.
4. Posouzení přínosu stanovení hladiny vybraných složek komplementu (C3, C4, C1q) a anti-C1q protilátky pro zhodnocení aktivity SLE a přítomnosti lupusové glomerulonefritidy. Vyšetřovaný soubor zahrnoval 65 pacientů se SLE z toho 22 pacientů s biopsicky ověřenou lupusovou glomerulonefritidou. Výsledky potvrdily nález zvýšené koncentrace anti-C1q protilátek a současně snížené hladiny C1q složky komplementu u pacientů s lupusovou glomerulonefritidou a s aktivním onemocněním. Hladiny anti-C1q a C1q korelovaly signifikantně s C3, C4, s hladinou anti-dsDNA protilátek a indexem aktivity ECLAM a SLEDAI. Hladina anti-C1q navíc korelovala s hladinou antinukleosomálních protilátek.
5. Posouzení přínosu vyšetření antinukleosomálních protilátek, neopterinu, trombomodulinu a dalších parametrů jako indikátorů klinické aktivity SLE a nástrojů k monitoraci průběhu choroby. Soubor tvořilo 52 pacientů se SLE rozdělených na podsoubory se stabilizovaným onemocněním, vysokou a narůstající aktivitou a klesající aktivitou SLE. Výsledky prokázaly slabší, přesto signifikantní korelaci anti-dsDNA a antinukleosomálních protilátek a C3 a C4 složek komplementu s aktivitou SLE. Vyšší korelace s indexem aktivity ECLAM byla zaznamenána pro neopterin a zejména pro trombomodulin. Trombomodulin rovněž rychle reagoval na změny aktivity onemocnění a odrážel efekt léčby.
6. Posouzení přínosu vyšetření molekul sCD30 a sCD40L jako potenciálního indikátoru aktivity SLE. Vyšetřen byl soubor 65 pacientů SLE. Autorka prokázala vysoce signifikantní rozdíl v sérových hladinách sCD30 mezi pacienty se SLE a kontrolním souborem a mezi pacienty s aktivní a neaktivní formou SLE. Hladina sCD30 signifikantně korelovala s C3 a C1q složkami komplementu a klinickými indexy ECLAM a SLEDAI, což poukazuje na možnost využití tohoto nespecifického markeru pro sledování aktivity RA. Signifikantní zvýšení hladiny sCD40 bylo prokázáno u pacientů se SLE v porovnání s kontrolním souborem.

Autorka kriticky hodnotí a diskutuje získané výsledky v kontextu existujících studií a hodnotí význam získaných poznatků pro praxi. Cílem těchto snah je zpřesnění diagnostiky systémových autoimunitních revmatických onemocnění, jejich včasná diagnostika, monitorace aktivity, sledování efektu léčby, případně hledání nových léčebných možností. Na základě získaných výsledků a v kontextu dosavadních poznatků se některé ze sledovaných parametrů v průběhu let staly nedílnou součástí rutinní laboratorní diagnostiky autoimunitních onemocnění, jiné si rozhodně zasluhují další sledování.

Hodnocení

Předložená disertační práce se zabývá aktuální tematikou, je zpracována na vysoké úrovni. Zcela splňuje požadavky kladené na tento typ práce. Cíle práce jsou jasně a přehledně definovány. Zvolené metody, velikosti zkoumaného souboru a zvolené statistické metody odpovídají cílům práce. Výsledky jsou přehledně formulovány. Práce je psána čtivou češtinou. Literatura je citována konzistentně dle přijímané konvence v přiměřeném rozsahu a je aktuální. Grafy a tabulky jsou přehledné a přehledně popsány. Závěry jsou jasně formulované a naplňují stanovené cíle. Autorka přispívá tvůrčím způsobem k poznatkům ve zpracované oblasti výzkumu. Získaná data jsou výsledkem dlouholeté plodné spolupráce s lékaři III. interní kliniky FN Olomouc. Výsledky práce napomohly zavedení některých laboratorních testů do rutinní praxe, jiné přispěly k dosavadnímu poznání v dané oblasti.

K práci mám dva dotazy:

1. Anti-CCP1, anti-CCP2, anti-CCP3 nebo anti-CCP3.1? Jaké z dostupných testů používat v laboratorní diagnostice revmatoidní artritidy v klinické praxi, jejich výhody a nevýhody?
2. Jaký je význam nově detekovaných autoprotilátek proti karbamylovanému peptidu (anti-CarP) v diagnostice revmatoidní artritidy?

Závěr:

Posuzovaná disertační práce obohacuje a doplňuje naše poznání dané problematiky laboratorní imunologické diagnostiky systémových autoimunitních revmatických onemocnění. Výsledky práce a její zpracování svědčí nejen pro autorčiny vynikající teoretické znalosti zkoumané problematiky, ale také pro schopnost aplikovat je v konkrétní situaci (sestavení souboru, volba metodik, schopnost interpretace výsledků). Tato práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji její přijetí v předložené formě komisi oborové rady DSP v oboru lékařská imunologie a na jejím základě po projednání, úspěšném absolvování oponentského řízení a splnění zákonných podmínek udělení akademického titulu Ph.D. dle § 37 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

doc. MUDr. Petr Němec, Ph.D.

II. interní klinika FN u sv. Anny v Brně a LF MU Brno

Pekařská 53

656 91 Brno

V Brně dne 12.5.2014