

Oponentní posudek na doktorskou disertační práci:

**Optimalizace metodického repertoáru určeného
pro laboratorní diagnostiku autoimunitních
onemocnění štítné žlázy**

MUDr. Dimitar Hadži Nikolov

Doktorská disertační práce

Hradec Králové 2006

Oponentský posudek na disertační práci
MUDr. Dimitar Hadži Nikolova:
„Optimalizace metodického repertoáru určeného pro laboratorní
diagnostiku autoimunitních onemocnění štítní žlázy“

Předložená disertační práce vychází z dlouhodobého vědeckého zaměření Fingerlandova ústavu patologie Lékařské fakulty KU v Hradci Králové.

Zakladatel ústavu Prof. MUDr. Antonín Fingerland vytvářel ve své badatelské činnosti vázané na rozvoj laboratoří zaměření pracoviště do oblasti výzkumu v rámci bakteriologie a virologie. V rámci této koncepce navázal a rozvíjel imunopatologickou laboratoř bývalý asistent a současný profesor MUDr. Zdeněk Nožička, CSc.

Disertační práce vyplývá z výše podmíněného laboratorního zaměření, na kterou navazuje její předkladatel MUDr. Dimitar Hadži Nikolov.

Práce je rozčleněna do 16-ti literárních úseků, kde podstatnou část tvoří současné poznatky z oblasti imunologie, dále kapitola klasifikace autoimunitních chorob a předkládané metody imunofluorescenční se zaměřením k výtěžnosti imunoradiometrické analýzy. Aplikace této metody je vázaná na tkáňovou strukturu štítné žlázy s rozvedením výsledků. Z histopatologických jednotek jsou hodnocené výsledky porovnávány s Hashimotovou thyreoiditidou a fokální lymfocytární thyreoiditidou. Jedná se o cytohistologická korelace nálezů.

Disertační práce je z hlediska formálního dokladována prezentací výsledků v přehledných tabulkách a grafech, dále s přesvědčivou fotodokumentací a s bohatým literárním zázemím v počtu 268 literárních zdrojů.

Podklad pro předkládanou disertační práci tvoří 21 publikací autora a 58 přednášek, některé se spoluúčastí.

Předložená práce se vztahuje k jednomu z nosných programů činnosti Fingerlandova ústavu patologie, a to k problémovému okruhu imunopatologických onemocnění. V úzké spojitosti s touto orientací bylo i zavedení imunofluorescenční detekce autoprotilátek, jež jsou důležitým indikátorem některých autoimunitních onemocnění. K jejich detekci často používaná nepřímá imunofluorescenční metoda (IMFL) má vedle svých výhodných rysů (operativnost, pohotovostní aplikace, možnost statimového vyšetření, závislost titru autoprotilátek na tíži celkového stavu) také i rysy nevýhodné. Podobně jako v klasické serologii byla titrace séra shledána postupem schopným poskytnout reprodučibilní kvantitativní výsledky i při vyšetření imunofluorescenčním (IMFL).

Okolnosti, že mohutnost fluorescence kolísá a vykazuje různý stupeň viditelných změn, bylo využito při hodnocení intenzity IMFL nálezů semikvantitativním odhadem. Vyvrcholením této snahy byly pokusy přerodit IMFL metodiku na exaktní postup a zavést jakousi kvantitativní imunofluorescenci při níž by fotometricky odečítaná intenzita fluoreskujících stop, měla být odrazem titru sledované protilátky.

Několik let soustavného zájmu odborné literatury o tento problém, ale ukázalo nereálnost této představy a tak jediným postupem zachycujícím srovnatelné kvantitativní stránky vyšetření na autoprotilátky je těžkopádná titrace.

V běžné praxi se kliničtí pracovníci ve většině případů spokojili jen se semikvantitativním odhadem, tedy jakousi náhražku exaktních vyčíslených údajů k jejichž dosažitelnosti mezi tím dospěl vývoj imunochemie po izolaci odpovědných antigenů.

Autor disertace řešil tyto obecně formulované otázky na konkrétním problému diagnostiky lymfocytárních zánětů štítné žlázy, kdy musel konstatovat nesouhlas mezi výsledky imunofluorescenční detekce autoprotilátek vystupujícími na straně jedné a výsledky vyšetření na stejné protilátky metodou imunoradiometrickou (IRMA) na straně druhé.

Aby využil všechny dostupné údaje, zajistil konfrontaci výsledků v dalších, celkem třech směrech, jednak porovnáním výsledků punkční cytologie štítné

žlázy s výsledky histologického ověření diagnózy v chirurgickém resektátu, dále porovnáním morfologických (cytologických a histologických) výsledků s výsledky vyšetření IMFL a konečně srovnáním výsledků detekce autoprotilátek cestou IMFL versus výsledky pátrání po téže protilátce metodou IRMA.

Vyšetřované skupiny měly dostatečnou početnost.

Prvá z nich (cytologie versus histologie) měla 182 členů, druhá morfologie versus IMFL 246 členů a největší z nich (IMFL versus IRMA) měla plných 973 členů. Srovnávané skupiny nebylo možno libovolně rozšiřovat. Zařazení do srovnávané skupiny totiž spočívalo na podmínce, aby měl daný případ provedeno obojí srovnávané vyšetření.

Ukázalo se, že punkční biopsie, která jinak je v diagnostice solitárních uzlů štítné žlázy naprosto suverénním prostředkem, pak u fokální lymfocytární thyreoiditidy (FLT) dosahuje její diagnostická přesnost jen 20%, což autor vysvětluje odběrovou chybou (nezastižení ložiskového nálezu fokální lymfocytární thyreoiditidy - FLT).

Jde o výklad, se kterým lze souhlasit vzhledem k tomu, že u difuzního postižení typu Hashimotovy thyreoiditidy je cytologická přesnost 75%.

Pokud jde o srovnání výsledků získaných IMFL metodou s výsledky morfologického přístupu (t.j. cytologie a histologie), pak jejich vzájemná shoda dosahovala u případů Hashimotovy thyreoiditidy zhruba 95% (96% při vyšetření na autoprotilátky proti thyreoglobulinu - TG a 93% při vyšetření na protilátky proti thyreoperoxidáze - TPO).

U případu fokální lymfocytární thyreoiditidy dosahovala vzájemná shoda pro thyreoglobulinové protilátky 63% a pro autoprotilátky proti thyreoperoxidáze 62%.

Jako mimořádně důležité se ukázalo, že komparativní neshoda již dříve konstatovaná mezi IRMA a IMFL výsledky nemá jednotný základ, nýbrž naopak strukturální charakter. Rozložení neshod je závislé na intenzitě IMFL

reakce. Nálezy hodnocené při IMFL vyšetření jako negativní jsou ve skutečnosti ve vynikající shodě s výsledky (rovněž negativními) získanými IRMA metodou a to kolem 99% (jak pro thyreoglobulinové protilátky, tak i ve věci protilátek proti thyreoperoxidáze). Dobrá shoda panuje také mezi silně pozitivními výsledky imunoflorescenčními na straně jedné a pozitivními údaji poskytnutými IRMA metodou na straně druhé.

V podrobnostech 83% pro autoprotiilátky proti thyreoglobulinu a 67% pro autoprotiilátky proti thyreoperoxidáze.

Naproti tomu výsledky u nižších intenzit IMFL vyšetření (t.j. na + nebo ++) ve srovnání s výsledky IRMA je velký počet neshod, které jejich využití v odpovídajícím rozsahu uvedených semikvantitativních hodnot (nízké a střední hodnoty) ruší ba přímo znemožňuje.

Z rozboru uvedených údajů pak autor navrhuje opatření pro praktickou diagnostiku, která by měla přispět k eliminaci hrozících, ale nyní předvídatelných chyb.

I toto je třeba považovat za nový poznatek upozorňující na problematické úseky IMFL pozitivit, což umožňuje vyhnout se hrozícím chybným závěrům.

Aktualita zvoleného tématu je hodnotitelná ze dvou stran. Jedním z nich je biologická a laboratorní stránka problému, která je v práci sledována snahou o co největší zpřesnění navzájem porovnávaných metod. Druhou stránkou je otázka hospodárného využití stávající přístrojové techniky.

Po formální stránce má práce náležité členění, pouze kapitola týkající se materiálu, metodik a výsledků s příslušnými diskuzemi jsou seskupeny do tří relativně samostatných oddílů odpovídajících vztahům uvnitř porovnávaných skupin.

K přednostem práce patří to, že invenčně je pojato řešení vztahů mezi metodikami IMFL a IRMA, kde pro nesnadnou početní podchytitelnost bylo sáhnuto k řešení grafickému. Autor použil k vytvoření grafu počítače. Takže práce působí přesvědčivým dojmem, že jde o pojednání z 21. století.

Z technického hlediska je spis představován 128 stránkami, z nichž vlastní stat' má 36 stran, předmluva 3 stránky, seznam zkratk 2 stránky, poděkování 1 stránku, dále 8 grafů, 6 obrázků a 10 tabulek. Dále je 23 stran věnováno literárním citacím (celkem 268 položek). 56 citací není starších než 10 let a 33 citací není starších nežli 5 let.

K méně příznivým rysům práce patří zvláštní kostrbatý jazyk (ale bez gramatických chyb) a zatížení textu nadměrným didaktismem vysvětlujícím i obecně známé pojmy.

Vlastní poslání odborného textu disertace není těmito formálními nedostatky nijak dotčeno.

Autor předložené disertace nazvané: „Optimalizace metodického repertoáru určeného pro laboratorní diagnostiku autoimunitních onemocnění štítné žlázy“ zvládl samostatnou výzkumnou práci, provedl vytřídění archivovaného materiálu podle jednotného hlediska, dokázal zvolit upotřebitelné metodiky a ze získaných elementárních poznatků vyvodil závěry, které podrobil vyváženému a střízlivému rozboru. Práce vyhovuje požadavkům kladeným příslušnými předpisy na doktorskou disertaci.

Závěr:

Doporučuji, aby na základě předložené práce byla jejímu autorovi MUDr. Hadži Nikolovovi povolena obhajoba doktorské disertace v rámci řízení směřujícího k získání vědecké hodnosti PhD. v souladu s podmínkami, které vypočítává § 47, odst. (4) a (5) zákona 111/1998 Sb.

V Ostravě dne 2.5.2006

doc. MUDr. Jaroslav Horáček, CSc.
vedoucí Ústavu patologické anatomie ZSF OU