

## Oponentský posudek na doktorskou disertační práci MUDr. Aleše Bartoše **Antiaxonální protilátky u roztroušené sklerózy.**

V posuzované disertační práci předkládá autor výsledky několik let trvající studie, vycházející z vyšetření hladin antineurofilamentových protilátek u osob trpících roztroušenou sklerózou. Cílem disertační práce je posoudit možný přínos vyšetření těchto protilátek pro zpřesnění diagnostiky a monitorování vývoje roztroušené sklerózy, autoimunitní zánětlivé choroby, u níž přibývá dokladů, že při ní dochází k neuroaxonálnímu poškození a ztrátě. Originální výsledky byly získány na souboru tvořeném jak pacienty, trpícími roztroušenou sklerózou mozkomíšní, tak u kontrolního souboru, sestávajícího ze zdravých pacientů (CN), pacientů s různými chorobami NS (CD) a jedinců trpících neurodegenerativními chorobami (CDEG).

Autor je velmi dobře obeznámen s klinickou i laboratorní problematikou jak autoimunitních zánětlivých onemocnění, tak neurodegenerativních onemocnění. Cíleně se v posledních pěti letech věnoval vyšetření mozkomíšního moku se zaměřením na zánětlivé a neurodegenerativní markery. Zkoumal přínos a možnosti využití nově zaváděných likvorologických a imunochemických metod v klinické neurologii.

Úvodních třicet pět stránek práce je věnováno přehledu současných poznatků o roztroušené skleróze se zaměřením na imunologické aspekty a na měnící se pohled na povahu patologických dějů, jimiž byla donedávna roztroušená skleróza charakterizována.

Autor poukazuje na nejnovější poznatky svědčící o tom, že u roztroušené sklerózy se nejedná pouze o postižení axonální, projevující se změnami v bílé hmotě, ale že jde o difúzní postižení i šedé hmoty mozku. U roztroušené sklerózy tedy nedochází výlučně k axonální ztrátě, ale roli hraje též degenerace a ztráta neuronů, jež byly donedávna opomíjeny. Autor oprávněně poukazuje na to, že je nutno věnovat pozornost změnám, které se odehrávají v cytoskeletu. Poznatky o roli tubulinů, aktinu i dalších neuronálních proteinů, důležitých pro vytváření mikrofilament a mikrotubulů, jež představují významné stavební i funkční prvky neuronální tkáně, jsou důležité pro pochopení patologických dějů, k nimž u demyelinizačních onemocnění dochází. Při poškození nervové tkáně – ať již mechanické, hypoxické či zánětlivé povahy – dochází k aktivaci a různě intenzivní odezvě imunitního systému, který se významně podílí na dalším postižení nervové tkáně.

Ve druhé části práce, mající čtyřicet stran, předkládá autor původní výsledky vyšetření hladin specifických antiaxonálních, antineurofilamentových protilátek v séru a moku.

Následně kriticky hodnotí možný přínos této zatím jen ojediněle prováděné metodiky a poukazuje i na její úskalí a limity.

### 1) Aktuálnost zvoleného tématu

Téma, jemuž je disertační práce věnována, je aktuální. Představuje důležitý námět jak pro likvorologii, tak neuroimunologii. Dále pak je významné pro rozšíření škály diagnostických metod a cílenější léčbu velmi závažné skupiny autoimunitních demyelinizačních onemocnění, z nichž nejvýznamnější je roztroušená skleróza mozkomíšní. Nelze pominout význam zkoumané problematiky ani s ohledem na výzkum a diagnostiku neurodegenerativních onemocnění. Zejména demence a Parkinsonova choroba představují neobyčejně závažný zdravotně-ekonomický problém.

### 2) Cíl disertační kandidátské práce

Autor vycházel z hypotézy, že intratekální tvorba antineurofilamentových protilátek je u jedinců trpících roztroušenou sklerózou zvýšená, a že se jejich hladiny budou lišit u jednotlivých forem tohoto demyelinizačního onemocnění. K ověření uvedené hypotézy a dalších pěti podhypotéz se vyšetřoval

hladiny protilátek proti neurofilamentům – a to proti lehké a středně těžké podjednotce z neurofilamentového tripletu. Cíle práce shrnul autor do šesti otázek, na něž hledal na základě získaných výsledků odpovědi.

Hodnocená disertační práce, která je věnována aktuálnímu tématu, splnila podle názoru oponenta z větší části značně ambiciózně a široce vymezené cíle. I přes naznačenou výhradu je nutno uvést, že práce přináší cenné poznatky a podněty pro další výzkum dynamiky tvorby specifických protilátek zaměřených proti neuroaxonálnímu aparátu v mozkomíšním moku i séru.

### 3) Zvolené metody disertační práce

MUDr. Bartoš vycházel v disertační práci ze svých laboratorních a klinických zkušeností, které cílevědomě rozvíjel během stáží v uznávaných likvorologických a neuroimunologických laboratořích ve Velké Británii a v Rakousku. Disertační práci založil na multifaktoriální analýze klinických údajů a výsledků získaných vyšetřením vzorků moku a séra pacientů s RS (n 58) a kontrolní skupiny (n 104) metodou ELISA podle Silbera stanovující protilátky proti lehké a středně těžké podjednotce neurofilament. Vyšetření moku a séra bylo prováděno lékaři z Imunochemického oddělení Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Statistické zpracování bylo provedeno ve spolupráci s VŠCHT.

### 4) Výsledky disertační práce

Práce přináší původní poznatky o protilátkové odpovědi (antifilamentové protilátky) u osob trpících roztroušenou sklerózou, jež je srovnávána s kontrolní skupinou, tvořenou osobami považovanými za zdravé (CN), nebo trpící různorodými chorobami nervového systému (CD), dále pak i neurodegenerativními chorobami (CDEG).

V případě tvorby antifilamentových protilátek (lehká podjednotka – NFL) třídy IgM a IgG nebyla prokázána zvýšená intrathekální syntéza u skupiny pacientů s RS oproti většině jedinců tvořících kontrolní skupinu.

Za překvapivý lze označit průkaz statisticky významně zvýšené intrathekální tvorby antifilamentových protilátek u osob trpících neurodegenerativními chorobami.

Byl prokázán vztah mezi hladinou sérových a mokových protilátek (NFL) třídy IgG, ne však třídy IgM. Nepotvrdil se dále předpoklad, že by hladina těchto protilátek mohla mít vztah k trvání choroby a závažnosti klinického postižení i k stupni handicapu měřeného EDSS, MSSS s výjimkou průkazu vztahu mezi intrathekální syntézou protilátek třídy IgG a hodnocením v EDSS, MSSS.

Dále nebyl prokázán vliv léčby na intrathekální syntézu protifilamentových protilátek třídy IgM. U třídy IgG byla zjištěna nižší intrathekální hladina protifilamentových protilátek třídy IgG u léčených pacientů oproti pacientům neléčeným imunosupresivou a imunomodulancii.

Autor došel na základě uvedených výsledků k závěru, že vyšetření protifilamentových protilátek třídy IgM v moku nemá diagnostický význam, zatímco může být přínosné u osob s neurodegenerativními chorobami.

Vyšetření tvorby antifilamentových protilátek (středně těžká podjednotka – NFM) třídy IgM neprokázalo v séru odlišné hodnoty oproti kontrolní skupině. Naproti tomu byly sérové protilátky třídy IgG u jedinců s RS významně nižší oproti většině jedinců z kontrolní skupiny. Nebyl zjištěn vztah mezi hladinami protilátek IgM a IgG v séru a moku, ani ke klinickým a demografickým ukazatelům.

Naproti tomu intrathekální hladiny antifilamentových protilátek IgM a IgG třídy byly u osob s RS vyšší oproti zdravým osobám či běžným chorobám NS. Pouze u jedinců postižených neurodegenerativními chorobami byla intrathekální syntéza zvýšena podobně jako u pacientů s RS.

Nebyl prokázán vztah mezi sérovými, intrathekálními hladinami protilátek a typem RS, ani nebyly prokázány odlišné hodnoty stanovené ve vzorcích získaných při odběrech provedených v atace či remisi.

Nepochybně zajímavé bylo zjištění, že hladiny antineuronálních protilátek byly stonásobně až tisícinásobně vyšší v séru než v mozkomíšním moku - a to jak u pacientů s RS, tak u jedinců z kontrolní

skupiny. Hladiny IgG protilátek v moku byly u neléčených pacientů signifikantně vyšší oproti zdravým jedincům z kontrolní skupiny.

V případě ant filamentových protilátek (středně těžká podjednotka - NFM) soudí autor na základě uvedených výsledků, že vyšetření protifilamentových protilátek třídy IgM a IgG v moku má diagnostický význam. Neprokázal však vztah mezi stupněm syntézy a klinickými parametry a progresí choroby.

#### **5) Význam poznatků uváděných v disertační doktorské práci pro další rozvoj likvorologie, neuroimunologie a klinické neurologie**

Jak již bylo uvedeno, doktorská disertační práce shrnuje výsledky získané několik let trvající studii, které byly zaměřeny na vyšetření hladin antineurofilamentových protilátek v séru a v mozkomíšním moku u osob trpících roztroušenou sklerózou.

MUDr. Bartoš prokázal obdobně jako několik dalších autorů, že detekce protilátek proti neurofilamentům a sledování dynamiky jejich tvorby má své opodstatnění a to i přesto, že nebyly potvrzeny některé z hypotéz, z nichž práce vycházela.

Doktorand zjistil, že přes průkaz tvorby protilátek proti neurofilamentům o lehké a střední váze u autoimunitních zánětlivých a neurodegenerativních chorob, nebyl prokázán přesvědčivý vztah mezi jejich syntézou a klinickými projevy. Nepodařilo se prokázat ani k vývoji onemocnění, délce jeho trvání a ke stupni handicapu, byť literární údaje nasvědčovaly možnosti existence takovýchto korelací.

Autor se spolupracovníky prokázali zvýšení tvorby antineurofilamentových protilátek u osob trpících neurodegenerativními chorobami, které tvořily jednu z kontrolních skupin.

Práce je přínosná pro českou likvorologii a neuroimunologii vzhledem k tomu, že přináší původní výsledky a poznatky, byť jejich aktuální praktický význam pro zpřesnění diagnostiky roztroušené sklerózy není zásadní povahy.

#### **6) Splnění podmínek pro dizertační doktorandskou práci**

Disertační doktorská práce, která shrnuje výsledky pět let trvající likvorologické a neuroimunologické studie, splňuje po stránce věcné i formální podmínky doktorandského studia nezbytné pro udělení titulu PhD.

Posuzovaná disertační práce je dokladem toho, že MUDr. Bartoš má hluboké znalosti z likvorologie a neuroimunologie, které uplatňuje jak při výzkumu, tak klinické praxi zaměřené na neurodegenerativní choroby a na roztroušenou sklerózu. Svědčí o tom jeho publikační, přednášková a aktivita v odborných společnostech.

Zvolené téma zpracoval autor s velmi dobrou znalostí problematiky, což doložil v doktorské disertační práci, přinášející cenné podněty pro likvorologický a neuroimunologický výzkum zaměřený na demyelinizační a neurodegenerativní choroby.

#### **7) K předložené disertační práci má oponent následující připomínky a otázky**

ad s.6 - S ohledem na srozumitelnost textu je vhodné opravit překlep, kdy lehká podjednotka je označena zkratkou NFM, přičemž obdobná chyba se opakuje i v autoreferátu.

ad s.49 Přehlednosti a srozumitelnosti textu by podle názoru oponenta prospělo, kdyby pacienti s RS byli uvedeni v přehledné tabulce. Údaje, které definují tento soubor pacientů na s. 49 zejména

19.9.2006

4

s ohledem na pacienty, jejichž nálezy a stav odpovídá dg. CIS, nejsou dostatečně podrobné a přehledné.

ad s.50,76 a další – Otázka kontrolní skupiny je nepominutelná vzhledem k opakovaně zjištěným vysokým hladinám protineurofilamentových protilátek, jež vedly k nejednoznačné interpretaci výsledků a ztížily statistické zpracování. Oponent by rád věděl, zda se autor pokusil zjistit, jak se následně vyvíjel zdravotní stav jedinců zařazených do kontrolní skupiny jako „normální osoby“ (CN)? Jednorázové vyšetření bez následného sledování vývoje zdravotního stavu a potvrzení, že abnormní výsledky nebyly projevem zatím nemanifestní choroby, může vést k nepřesným výsledkům a zkreslení parametrů získaných od takto vytvářené kontrolní skupiny tvořené zdánlivě zdravými osobami.

ad s. 52 a dále – Jaký byl podíl autora na provádění laboratorní části práce, tj. stanovení protilátek proti filamentům?

Může autor odhadnout, jak velký počet likvorových neuroimunologických laboratorí se bude obdobnou problematikou zabývat? Může dojít k zvýraznění diagnostického přínosu této metody.

ad s. 75 a dále - Proč autor zvolil v disertační práci méně přehlednou formu kapitoly 13? - Diskuze, v podobě, jež je uvedena v autoreferátu, je zpracována přehledněji. Výstižněji shrnuje výsledky získané autorem. Autor v ní hodnotí, zda a v jakém rozsahu byly potvrzeny původní hypotézy. Uvádí, zda a jak se podařilo zodpovědět na otázky, jimiž charakterizoval cíle disertační práce. Recenzent soudí, že tato část disertační práce (in extenso), která má stěžejní význam, vznikala ve spěchu. Má za to, že by bývalo vhodné vzhledem k objemu práce, kterou autor nepochybně řešení projektu věnoval, při dokončování disertačního spisu tuto kapitolu dopracovat

ad s. 84 Oponent soudí, že odstavec, který závěrem shrnuje základní zjištění neměl být součástí Diskuze. Má za to, že by celkovému vyznění doktorské disertační práce prospělo, kdyby byl závěr zpracován jako stručná a přehledná kapitola shrnující výsledky, doporučení a náměty pro další výzkum.

V Praze 19.zář 2006

doc. MUDr. M. Bojar, CSc.

