

Vážený  
Prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.,  
předseda oborové rady neurovědy

---

Věc: disertační práce MUDr. Evy Krasulové, lékařky neurologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze, „**Lymfocytární subpopulace, cytokinová produkce a transplantace kmenových buněk u pacientů s roztroušenou sklerózou**“.

**MUDr. Eva Krasulová** pracuje v Centru pro demyelinizační onemocnění Neurologické kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. MUDr. Krasulová se věnuje imunitním mechanismům, které u nemocných s roztroušenou sklerózou vedou k zánětlivým změnám. Ve své disertační práci využívá cytoflowmetrie, stanovuje zastoupení a změny jednotlivých lymfocytárních subpopulací, změny produkce cytokinů. Výsledky těchto vyšetření jsou využívány při sledování efektu terapie a některé z těchto parametrů lze využít také pro predikci dalšího vývoje choroby.

MUDr. Krasulová si pro svou disertační práci stanovila **tyto cíle**.

1. **Definovat skupinu nemocných** s agresivní roztroušenou sklerózou. Jednalo se o retrospektivní analýzu a tyto nemocní (n=26) byli v letech 1998-2008 léčeni vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk.
2. **Popsat allogenní transplantace kmenových buněk** – kazuistiky dvou pacientek s autoimunitním onemocněním (RS a Neuromyelitis optica)
3. **Sledovat vývoj jednotlivých lymfocytárních subpopulací a produkci intracelulárních cytokinů** v periferní krvi u tří skupin pacientů:  
A/ pacientů s klinicky izolovaným syndromem léčeným interferonem beta,  
B/ pacientů s relaps-remitentní roztroušenou sklerózou léčených natalizumabem  
C/ pacientů s agresivní roztroušenou sklerózou léčených vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk.  
Tyto skupiny byly vyšetřovány a sledovány prospektivně.
4. **Korelovat** jednotlivé lymfocytární subpopulace a produkci intracelulárních cytokinů v periferní krvi pacientů všech tří skupin před zahájením a v průběhu léčby s klinickou aktivitou onemocnění vyjádřenou počtem atak a progresí neurologické invalidity (za použití EDSS) s cílem najít společný imunologický prognostický ukazatel aktivity onemocnění.

Celkem se v **prospektivních skupinách** jednalo o 33 nemocných s klinicky izolovaným syndromem, 17 nemocných léčených natalizumabem a 14 nemocných léčených vysokodávkovanou imunoablací. Při započtení retrospektivně hodnocené skupiny i prospektivně sledované skupiny nemocných se celkově jedná o 40 nemocných s agresivní roztroušenou sklerózou léčených vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologických hematopoetických kmenových buněk. V této skupině se nevyskytlo žádné úmrtí v souvislosti s imunoablací (do 100 dnů od provedení). Dvě úmrtí byla již bez vztahu k imunoablaci (peritonitida po 30 měsících a zhoubný tumor mozku –diagnostikován byl 39 měsíců po proceduře).

**Prognostická hodnota** byla prokázána při kombinaci vstupní absolutní hodnoty CD19+ lymfocytů s procentuální hodnotou CD3+ ve 3. měsíci sledování. Byl prokázána statisticky významný vztah k EDSS v měsíci 24. Vyšší počet CD19+ lymfocytů byl prokázána u pacientů bez progresse onemocnění.

**Disertační práce** má 95 stran. **Úvod** má 40 stran a autorka v něm podává stručný přehled jednotlivých forem RS, diagnostických možností (včetně rozvoje diagnostických kritérií), produkce a efektu jednotlivých cytokinů, jednotlivých forem lymfocytů, škály užívané u RS, problematiku imunoablace u RS i krátkou zmínku o neuromyelitis optica. **Vlastní práce** (42-70) popisuje metodiku, procedury, výsledky, kazuistiky dvou nemocných s allogenní transplantací kmenových buněk, grafy, statistické vyhodnocení. V **diskusi** (71-79) dosti podrobně zmiňuje literární údaje na léčbu agresivní forem RS, autogenní i allogenní imunoablaci, korelaci jednotlivých typů lymfocytů s aktivitou nemoci, prognostickými faktory, komplikace metod. **Závěr** je stručný a výstižný. **Literatura** obsahuje 221 citací, z nich je 19 je recentních (do 3 let), 5 českých (z nich 1 autocitace). V **oddílu příloh** jsou in extenso přiloženy 3 práce s impakt faktorem, ve kterých je dr. Krasulová 2x prvním autorem a jednou třetím. V seznamu vlastních prací jsou další 3 publikace s IF a 8 prací bez IF.

### **Oponentský posudek podle jednotlivých bodů**

**a/ Aktuálnost zvoleného tématu.** Téma je velmi aktuální. Imunomodulační léčba se velmi široce využívá a monitorování imunologických procesů je obtížné. Definice jednotlivých subpopulací lymfocytů přispívá ke kvalitnějšímu stanovení imunologických procesů, ke stanovení prognózy. Pro agresivní formy RS s omezenou odpovědí na imunomodulaci je imunoablace velmi logickým a dostupným řešením terapie.

**b/ Zda disertace splnila svůj cíl.** Dr. Krasulová si stanovila cíle, které se jí podařilo splnit. Podala definici agresivní formy RS – nemocní byli léčeni imunoablací v letech 1998-2008. Popsala allogenní transplantaci kmenových buněk u dvou pacientek. Sledovala a výstižně popsala vývoj lymfocytárních subpopulací a produkci cytokinů u tří skupin nemocných s RS. Podařilo se najít a definovat imunologický parametr, který může být využit ke stanovení prognózy u jednotlivých nemocných.

**c/ Zvolené metody zpracování** Laboratorní metody byly na profesionální úrovni (průtoková cytometrie, stanovení lymfocytárních subpopulací, intracelulárních cytokinů). Při statistickém zpracování s využitím parametru „progression free interval“ – Kaplan-Meierova křivka, porovnání pomocí Coxova F testu. Pro porovnání sledovaných skupin ve vztahu k imunologickým parametrům byl využit dvouvýběrový oboustranný Studentův t-test, ANOVA. K nalezení predikčního ukazatele vývoje onemocnění byla použita mnohočetná regresní analýza. Statistické metody odpovídaly současným trendům.

**d/ Výsledky disertace s uvedením nových poznatků.** Výsledky disertace rozšíří znalosti o problematiku subpopulací lymfocytů a produkci intracelulární cytokinů. Nalezený parametr predikce průběhu onemocnění je zcela novým faktem. Možnosti imunoablace jsou sumarizovány a výsledky jsou velmi povzbudivé. Není zcela vyloučenou použít i allogenní transplantace kmenových buněk ve zcela výjimečných a přesně definovaných případech.

**e/ Význam práce pro společenskou praxi a další rozvoj vědy.** Na podkladě výsledků (lymfocyty, cytokiny, predikční faktor) lze lépe definovat imunologický stav nemocných s RS a predikovat vývoj, event. vybrat další léčebný postup. Možnost imunoablace je důležitým krokem u agresivních forem RS, u kterých jsou možnosti imunomodulační léčby vyčerpány.

**f/ Připomínky.** Celá práce je psána živým jazykem, srozumitelně, s minimem drobných chyb.

Pozorné pročtení disertační práce a příloh vedlo k celé řadě **otázek, z nichž 3** nyní uvádím.

1. V prvních 3 letech po imunoablaci bylo u 70.8% Vašich nemocných období bez progresu, přitom v dalších 3 letech již pouze u 29.2%. Který z uvedených mechanismů se **nejvýznamněji podílel na nárůstu progresu** v letech 3-6 po imunoablaci.
2. Imunoablace má větší efekt na nemocné s krátkým trváním RS, nižšího věku a s dosud relabujícím průběhem. Vliv celkové invalidity (dle EDSS) však nemá vztah na účinek léčby pomocí imunoablace. – V těchto dvou větech je určitý nesoulad – téměř si protřečí. Proč tedy **není význam celkové invalidity** – starší nemocní, často již bez jasných atak, s dlouhým trváním RS a často i s výrazným podílem nezánettivých momentů - tak důležitý pro efekt imunoablace?
3. Jak si odvozujete **protektivní význam** absolutní hodnoty CD19+ na průběh RS bez progresu?

Po pečlivém prostudování disertační práce MUDr. Evy Krasulové doporučuji práci k obhajobě (dle par. 47 VŠ zákona 111/98 Sb.). Dr. Krasulová prokázala předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci, práce splňuje požadavky kladené na disertaci v daném oboru. Doporučuji udělení titulu „Ph.D.“ za jménem

Pardubice, 2013-02-02

doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc.

PARDUBICKÁ KRAJSKÁ NEMOCNICE, a.s.  
Neurologická klinika  
Kyjevská 44, 532 03 Pardubice  
tel.: 466 011 111  
-4-

Doc. MUDr. Edvard Ehler CSc.  
65 001 066