

Oponentský posudek disertační práce

MUDr. Tomáše Hrnčíře

The role of gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet in the development, maturation and function of the immune system

Tématem předkládané práce je vliv mikroorganismů na rozvoj imunitního systému. Že mikroorganismy ovlivňují vývoj imunitního systému je všeobecně uznáváno, ale mechanismy, jakými se to děje zdaleka nejsou plně objasněny. Působení mikroorganismů na imunitní systém je podkladem hygienické hypotézy. Vesměs imunostimulačního a regulačního působení mikrobů a jejich složek je snaha využít např. používáním různých adjuvancií nebo probiotik, ale do nedávna bylo, a v řadě případů je dosud, toto použití do velké míry empirické. Studium mechanismů těchto reakcí je společensky závažné, protože jejich znalost by umožnila nové preventivní a léčebné přístupy zejména u autoimunit a alergií.

Autor měl možnost pracovat v době svého doktorandského studia v Gnotobiologické laboratoři MBÚ AV ČR, které má se studiem vztahů makroorganismu a mikroorganismu dlouholeté zkušenosti a požívá mezinárodního renomé. Toto pracoviště Dr. Hrnčířovi umožnilo pracovat s unikátními modely bezmikrobních a geneticky definovaných zvířat.

Disertace je psána anglicky a je vypracována klasickým způsobem – tj. je členěna na úvod, záměry, metody, výsledky, diskusi a závěry a je doplněna rozsáhlým přehledem literatury. Po formální stránce nemám k práci připomínky. Příložen je seznam 9 autorových publikací z nichž 6 již vyšlo v impaktovaných časopisech – u těchto prací však Dr. Hrnčíř není prvním autorem. Jedna z prací, kde je prvním autorem je teprve připravována a druhá byla odeslána do tisku – doufám, že je již k tisku přijata, neboť je to jednou z podmínek obhajoby.

Práce je velmi dobře a cílevědomě koncipována. Záměry jsou formulovány v 8 bodech a podle těchto bodů jsou též přehledně prezentovány výsledky. Je třeba říci, že všechny záměry byly splněny. Vytyčené otázky byly studovány na 3 základních skupinách zvířat: na konvenčních myších, na bezmikrobních myších krmných dietou s nízkým obsahem LPS a na bezmikrobních myších krmných dietou s vysokým obsahem LPS. Účinků, které má na vývoj imunitního systému fyziologická střevní flora lze částečně dosáhnout i za

bezmikrobních podmínek působením LPS v dietě. Za nejzávažnější, původní a velmi zajímavé výsledky pokládám zjištění týkající se stimulace Treg. Tyto výsledky podporují a v mnohém vysvětlují hygienickou hypotézu. Významné výsledky přineslo srovnání reaktivity imunokompetentních myši s myši SCID, které osvětlilo jeden z mechanismů spolupráce přirozené a adaptivní imunity (tlumení přirozené imunity regulačními mechanismy imunity adaptivní) a podíl přirozené a adaptivní imunity při reakci na LPS, což je velmi důležité pro poznání dějů při G- sepsích a při endotoxinovém šoku. Z hlediska práce s bezmikrobními zvířaty je také důležité zjištění velkých – řádových – rozdílů ve množství LPS, který obsahují různé pro myši používané diety.

K práci mám některé připomínky, které naprosto nesnižují její hodnotu a některé otázky:

- Vzhledem k významu výsledků týkajících se buněk Treg bych přivítala v úvodu podrobnější pojednání o těchto buňkách. Je však třeba uznat, že je o nich dobře pojednáno v diskusi.
- Vzhledem ke způsobu zpracování disertace jsou „Metody“ poměrně stručné a nevedlo by na tomto místě uvést některé literární odkazy
- Ve výsledcích mohlo být podrobněji charakterizováno hodnocení buněčných populací průtokovou cytometrií včetně negativního vymezení buněk. Nebylo mi vždy jasné, jsou-li hodnoceny všechny leukocyty nebo jen lymfocyty.
- Obr. 3 – nejde spíše o celkové leukocyty než lymfocyty?
- Tab. 1 – položka „total“ znamená všechny buňky z analyzovaného orgánu nebo všechny lymfocyty?
- Obr. 14 a 15 – jde o % CD 4+ a CD8+ ze všech T lymfocytů, ze všech lymfocytů nebo ze všech buněk izolovaných z jednotlivých orgánů? V thymu je uváděno kolem 90% CD4+ a 80%CD8+. To je v thymu tolik dvojitě pozitivních buněk?
- Proč se při odchovu imunokompetentních GF myši používá „foster mother“ myši SCID?
- Byly koncentrace LPS v dietách standardní? – přibližně stejné v různých šaržích diety?
- Působení LPS nezůstává jistě omezeno jen na zažívací trakt. Přesto působením LPS z diety se zvyšují počty přirozených Treg buněk CD4+Foxp3+ v mesenterálních uzlinách, ale ne ve slezině. Je nějaký podstatný rozdíl mezi supresivními mechanismy v mesenterálních uzlinách a ve slezině?

ZÁVĚR

Předložená disertační práce zcela splnila vytčené cíle a přinesla zajímavé a původní výsledky, které jsou významné pro pochopení mechanismů působení střevní flóry a patogeneze některých onemocnění způsobených nepřiměřenými imunitními reakcemi (sepse, alergie, autoimunita). Autor dokázal svou teoretickou i metodickou erudici, schopnost samostatné vědecké práce a kritické interpretace výsledků. Navrhuji přijetí práce jako podkladu pro udělení vědecké hodnosti PhD.



Doc. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc

Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK v Praze

V Praze 31. 8. 2008