

Prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.
Fakulta vojenského zdravotnictví UO
Centrum pokročilých studií
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Název disertace: *The role of gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet in the development, maturation and function of the immune system*
Autor disertace: *MUDr. Tomáš Hrnčíř*
Školitel: *Prof. MUDr. Helena Tlaskalova-Hogenova, DrSc.*
DSP: *Imunologie*
Rozsah práce: *126 stran, 35 obrázků, 1 tabulka, 204 citovaných prací.*
Oponent: *Prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.*

Předložená disertační práce MUDr. Tomáše Hrnčíře je zaměřena na analýzu efektů obsahu lipopolysacharidů v dietě podávané bezmikrobním myším. Smyslem celého bloku experimentů je přispět k pochopení vztahu mezi střevními mikroorganismy a antigenními stimuly jimi produkovanými a schopností imunitního systému hostitele efektivně regulovat následně indukované imunitní reakce. Praktický výstup pak směřuje k potvrzení „hygienické hypotézy“ vzniku stále častějších alergických onemocnění.

Nutno již na počátku hodnocení práce zmínit, že předložená práce je po formální stránce zdařilá. Autor pracuje s bloky informací, které na sebe logicky navazují a dávají tak celistvý přehled o studované problematice. Úvodní přehled znalostí o střevní mikroflóře a lipopolisacharidu gram-negativních bakterií je doplněn rozsáhlým přehledem receptorů rozpoznávajících obecné mikrobiální molekulární motivy či motivy související se stresovanými buňkami. Celá kapitola je zpracována velice přehledně a komplexně a jediné, co jí chybí, je část týkající se p47 GTPas jako nitrofagosomálních rozpoznávacích receptorů. Domnívám se, že tyto informace jsou dané problematice relevantní již z toho důvodu, že LPS (lipid A) gram negativních bakterií, právě prostřednictvím TLR4, je jedním z hlavních induktorů exprese p47 GTPas v makrofágách, dendritických buňkách i fibroblastech. A v kontextu kapitoly „LPS, TLR4 and other diseases“ (str.43-47) jsou tyto p47 GTPasy propojeny přes IRF3 s MyD88 independentní (TRIF dependentní) signální cestou. To by mohl být jeden z námětů na vědeckou rozpravu o tom, zda a do jaké míry se účastní interferony prvního typu na regulaci zánětlivých procesů a zda je možné, aby se v těchto procesech uplatnilo i následné rozpoznání alternativních ligand vedoucí k modulaci zánětu.

Další kapitoly, ospravedlňující volbu tématu, uspořádání experimentů, metodická část i část výsledková dávají zcela zřetelný obraz o cílech, metodách i výsledcích práce. Z výsledků práce je pak možné vyzvednout podrobnou analýzu lymfocytových subpopulací konvenčních a bezmikrobních myší krmených dietami s rozdílným obsahem LPS. Z výsledků je patrné, že vliv obsahu LPS v dietě na počet a frekvenci jednotlivých buněčných populací se projevuje pouze v lymfatické tkáni bezprostředně přiléhající nebo drénující oblast střeva. Systémově se tento vliv neprojevil. Z tohoto důvodu by bylo zřejmě vhodnější použít k monitorování produkce cytokinů spíše buňky mezenterálních lymfatických uzlin nebo Peyerských plaků,

než buňky slezin. Otázkou rovněž zůstává funkční význam zvýšeného počtu Foxp3 pozitivních CD4+ a CD8+ T buněk v mezenterálních lymfatických uzlinách a Peyerských placích při prakticky nezměněných poměrech zastoupení těchto typů v lymfoidních populacích. Přitom bylo procentuální zastoupení CD4+Foxp3+ T buněk zvýšeno působením diety s vysokým obsahem LPS prakticky pouze v případě mezenterálních lymfatických uzlin.

Z výše uvedených důvodů je nutno souhlasit s velice opatrnou interpretací výsledků uvedenou v diskusi a závěrech práce s jedinou výjimkou. Tou je tvrzení, že přítomnost LPS ve sterilní dietě imituje efekty přirozené kolonizace střeva (str. 99). Z výsledků uváděných v předložené disertační práci však vyplývá, že dieta s LPS u gnotobiontů ve srovnání s konvenčními zvířaty působí pouze velice omezeně na buněčný základ i na profil produkovaných cytokinů slezinnými buňkami po stimulaci ConA a LPS. V diskusi a závěrech mi rovněž chybí zhodnocení úlohy adaptivní imunity v patogenezi septického šoku s využitím SCID myši tak, jak je to deklarováno v kapitole „Research design“ na str. 53.

Poslední poznámka se týká vlastně konceptu práce v oblasti vlivu sterilní diety a obsahu LPS na funkčnost imunitního systému. V případě, že dieta má přirozený obsah LPS, má i přirozený obsah ostatních mikrobiálních antigenů. Je možné odlišit vliv LPS od vlivu ostatních mikrobiálních antigenů? Nebyla by možná kontrola např. porovnáním s myší linií s defektním TLR4? Je vůbec nutné určit mikrobiální komponenty, které se na dokumentovaných efektech podílejí?

K práci mám ještě několik konkrétních poznámek, které se vztahují většinou k úvodní kapitole, nemění však nic na smyslu a významu textu. Uvádím je zde jen pro upřesnění.

Str. 2: Termín „commensal paradox“ – setkal jsem se s ním prvně v devadesátých letech, kdy vztah mezi komensálními bakteriemi a buňkami mukózních povrchů byl přirovnán k biokomunismu s představou, že jak prokaryotická tak eukaryotická buněčná složka těchto povrchů tvoří unikátní tkáň. Bylo by proto vhodné místo odkazu na práci Tlaskalové a spol. uvést snad původní práci (Henderson, Wilson, *J Dent Res.* 1998 Sep;77(9):1674-83).

Str. 3: NLRs – leucine reach repeats – zkratka LRR, použitá zkratka sice patří do kontextu uváděného, vztahuje se však k „Nod-like receptors“. V kontextu na str. 7 je již zkratka NLRs použita správně. Totéž v seznamu zkratk – viz

Str. 6: Jaký je rozdíl mezi PRMs (pattern recognition molecules) a PRRs. Dělá to dojem, že obrázek byl přejat z publikace, která použila jiný, snad širší termín, a v práci pak označení těchto molekul koliduje s všeobecně přijatým termínem PRRs.

Str. 12: Obrázek svádí k představě, že TLRs mají stejný počet LRR. To však není pravda.

Str. 13 versus str. 15: TIRAP/Mal je jedna a tatáž adaptorová molekula dvěma skupinami autorů v roce 2001 nazvána různě, **TIRAP** od „TIR-containing adapter protein“ /Horng, T., Barton, G.M., and Medzhitov, R. TIRAP: An adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* **2**, 825–841 (2001)/, a **Mal** od „MyD88-adapter-like“ /Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G. et al. Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**, 78–83 (2001)/.

Str. 15: NEMO (NF-kappaB essential modulator) je spolu s IKK α a IKK β součástí IKK β signalosomu, což by v textu o signalizaci prostřednictvím TLR4 signální cesty mělo být zmíněno.

Závěrečné hodnocení: Předložená doktorská disertační práce MUDr. Tomáše Hrnčíře přináší celou řadu nových poznatků z oblasti studia efektů, které mohou ve vztahu k imunitnímu systému vyvolávat střevní mikrobiota či jejich molekulární komponenty v dietě. Oponovaná práce je jak po stránce obsahové, tak po stránce formální hodnotná a obsahuje autorem již publikované a opakovaně citované údaje. Díky své informační hodnotě mohou být některé úvodní kapitoly použity i pro výuku. Autor jednoznačně prokázal předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci. **Protože předložená práce splňuje všechna kritéria kladená na doktorské disertační práce, doporučuji práci MUDr. Tomáše Hrnčíře přijmout k obhajobě a využít ji jako hodnotný podklad pro udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.**

V Hradci Králové dne: 30. července 2008


Prof. Aleš Macela