

## Oponentský posudek disertační práce

Název práce: **Imunopatologie diabetu mellitu 1. typu – autoreaktivní versus regulační mechanismy**

Autor práce: MUDr. Zuzana Vrabelová  
Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Pediatrická klinika

Disertační práce pojednává o imunopatologii diabetu mellitu 1. typu (T1D) z pohledu autoreaktivity a regulace imunitní odpovědi. Experimenty byly zaměřeny na zkvalitnění metod predikce T1D. Autorka sledovala dva základní cíle: 1) S použitím proteinové „array“ prováděla screening cytokinové produkce v supernatantu získaného z kultivace mononukleárních buněk periferní krve před a po stimulaci specifickými diabetogenními antigeny. 2) Mapovala populaci  $CD4^+CD25^+$  regulačních T lymfocytů (Tregs) za použití markerů FoxP3 a CD127 a testovala jejich supresní funkci při nespecifické a specifické stimulaci. Klinický materiál (periferní krev) pocházel od pacientů s T1D (v době stanovení diagnózy T1D a poté s odstupem 6 a 12 měsíců), prvostupňových příbuzných pacientů s T1D (rodiče a sourozenci) a zdravých kontrol (bez osobní historie autoimunitních onemocnění).

Přímým výstupem této disertační práce jsou 3 původní práce v zahraničních časopisech s faktorem impaktu  $IF > 2,0$  a další 3 původní práce v zahraničních časopisech s faktorem impaktu  $IF > 1,0$  s touto prací úzce souvisejí. Autorka je uvedena jako první autor na dvou z nich, u ostatních je spoluautorem.

Samotná práce je rozdělena do čtyř celků: I. Teoretická část – imunopatologie diabetu mellitu 1. typu, II. Praktická část – souhrn vlastní práce (1. Subjekty, hypotézy a cíle, 2. Metodika, 3. Výsledky, 4. Diskuse, 5. Závěr), III. Seznam použité literatury (85 citací) a IV. Přílohy – vlastní publikace (6 původních prací). Kapitolám předchází Poděkování, Seznam použitých zkratk a Obsah. Celá práce je doprovázena 6 tabulkami a 10 barevnými obrázky.

Souhrnem mohu říci, že disertační práce je napsaná čtivým stylem bez překlepů. Nejsou v ní formální chyby. Teoretická část se logicky rozvíjí od obecného úvodu obsahujícího základní charakteristiku onemocnění, velmi jasně a výstižně podanou, přes imunopatologické mechanismy autoimunitního diabetu a nakonec se detailně zabývá regulačními T lymfocyty. Většina podkapitol souhrnu vlastní práce je vždy rozdělena na dvě podskupiny: 1) část zaměřenou na autoreaktivní T lymfocyty a cytokinovou produkci a 2) část zaměřenou na regulační T lymfocyty (Tregs). Tabulky a obrázky vhodným způsobem dokumentují celou práci. Její experimentální základ je pak prezentován v příložených publikacích.

Předložená disertační práce se zabývá velmi aktuálním a důležitým tématem. Diabetes mellitus 1. typu patří mezi velice závažná onemocnění s nutností doživotní substituce inzulínem a rizikem nepříjemných komplikací, vedoucích k těžkým důsledkům: ischemické chorobě srdeční se srdečním selháním, renální insuficienci s následnou dialýzou, slepotě, či diabetické noze vyžadující amputaci. Velice alarmující skutečností je, že incidence onemocnění rapidně narůstá a vykazuje trend k manifestaci v mladším věku. Zavedení účinné predikce a prevence by mělo významný vliv na snížení výskytu a zlepšení prognózy této závažné choroby.

Dotazy a připomínky k disertační práci:

1. Ve své práci uvádíte, že ve skupině zdravých příbuzných nesoucích rizikové alely pro rozvoj T1D byly nižší počty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs a diabetogenní stimulace vedla k signifikantně vyšší produkci IFN $\gamma$ . Měli jste také skupinu zdravých kontrol otestovanou na HLA alely II. třídy a hledali jste vztah mezi genovou predispozicí a počtem CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs či produkcí IFN $\gamma$ ? Bylo by významné zjistit, jestli tyto dva jevy souvisí pouze s predispozicí k autoimunitnímu diabetu (potom jsou typické pouze pro skupinu příbuzných), anebo jsou asociovány s genovou predispozicí (potom jsou charakteristické jak pro skupinu zdravých příbuzných, tak pro skupinu zdravých kontrol).
2. Obecný předpoklad Vaší studie pravděpodobně je, že u pacientů s T1D je stav po prodělané autoimunitní destrukci beta buněk pankreatu, u zdravých kontrol se žádná autoimunitní reakce neočekává a u prvostupňových příbuzných pacientů s T1D se předpokládá určitá predispozice, přičemž u některých z nich se může časem vyvinout autoimunitní diabetes. Máte takovou skupinu zmapovanou? Bylo by velice zajímavé vědět, které imunologické markery předcházejí klinickým projevům autoimunitní inzulitidy a jaká je jejich korelace se zavedenými metodami testování predikce T1D (stanovení genetického rizika a přítomnost autoprotilátek proti ostrůvkovým antigenům). Pokud by se totiž prokázalo, že rutinní testování stavu buněčné imunity je cennou a nenahraditelnou pomůckou predikce T1D v případě negativity na HLA rizikové alely a přítomnost autoprotilátek, stalo by se toto testování velice významným a nezbytným krokem pro zavedení účinné prevence autoimunitního diabetu.
3. Ze studií autoimunitních, především revmatologických, kde postižený orgán – kloub je daleko lépe dostupný analýze než pankreas, je známo, že imunitní profil se liší mezi lokální tkání a periferní krví. Diskutovali jste problém, zde to, co analyzujete v periferní krvi, skutečně odráží autoimunitní reakci probíhající v pankreatu?
4. Snaha o zavedení účinné prevence se odráží v řadě projektů a publikací. V praxi se preventivně podává inzulín. V poslední době se experimentálně zkouší nejrůznější monoklonální protilátky. Jaký je Váš názor na tyto postupy? Jakou prevenci byste jako lékařka doporučila v současnosti u zdravého dítěte, bez známek autoimunitních markerů či s nimi, v rodině s rizikem T1D? Co předpokládáte, že by mohlo být doporučeno v budoucnosti?

Závěr: Disertační práce je prezentována ve třech původních pracích publikovaných v zahraničních časopisech s faktorem impaktu IF>2,0. Autorka je uvedena jako první autor na dvou z nich. Dále je jako spoluautorka uvedena na dalších třech původních zahraničních článcích, které úzce souvisejí s touto problematikou. Disertace prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci. Jsou jednoznačně zplněny publikační kritéria, a proto doporučuji udělení titulu PhD.

Posudek vypracován: 29. 8. 2008

Doc. MUDr. Marie Černá, CSc.  
Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie  
3. LF UK Praha