



Sektor imunologie a gnotobiologie

Ved.: prof. RNDr. Blanka Říhová, DrSc.

Videňská 1083

142 20 Praha 4

Posudek na doktorskou disertační práci MUDr. Zuzany Vrabelové “Imunopatologie diabetu mellitu 1. typu – autoreaktivní versus regulační mechanismy“.

Autorka předkládá disertační práci “Imunopatologie diabetu mellitu 1. typu – autoreaktivní versus regulační mechanismy“, která je postavena na třech publikacích, z nichž u dvou je prvním autorem. Projekt je zaměřen na klinický výzkum autoimunitních a imunoregulačních mechanismů u diabetu 1. typu (T1D). Cílem projektu je nalezení charakteristických dysregulací imunitního systému u pacientů s T1D a u jedinců s vysokým rizikem onemocnění v porovnání se zdravými kontrolami. Tato data mají napomoci lepší identifikaci jedinců ohrožených rozvojem T1D a nalezení imunoregulačních mechanismů, které by mohly být cílem imunointervenčních strategií u lidí. Tento projekt reprezentuje tedy velice aktuální a důležité, ale zároveň i obtížné téma v současném klinickém výzkumu diabetu 1. typu. MUDr. Zuzana Vrabelová je navíc spoluautorem třech dalších (přiložených) publikací, které se také zabývají touto tematikou.

V první diskutované práci autoři sledovali metodou protein array *in vitro* produkci cytokinů buněk periferní krve (PBMC), též po stimulaci s vybranými autoantigeny T1D. Porovnávali vzorky od vždy 10 jedinců s T1D, přímých příbuzných a kontrol. Autoři popisují vyšší základní hodnoty pro spektrum IL-2,-4,-5,-13, a GCSF u kontrol v porovnání s jedinci s rizikem T1D. Po stimulaci autoantigeny našli rozdíl v IL-2,-13, GCSF a IFN- γ u kontrol v porovnání s ostatními skupinami. U jedinců s rizikem T1D pozorovali největší variabilitu sledovaných markerů a tendenci k vyšším hladinám IL-6. Jedná se o první, v podstatě pilotní projekt, u kterého nebyla vzhledem k malým skupinám vzata do úvahy HLA typizace ani korelace na přítomnost autoprotilátek. Autoři diskutují možnost využití této metodiky pro nalezení charakteristických profilů cytokinů u pacientů s T1D, a především pak u jedinců s rizikem rozvoje T1D.

V druhé diskutované práci autoři sledovali změny v populacích potenciálně regulačních CD4⁺CD25⁺ a NKT buněk u HLA typizovaných jedinců s rizikem T1D ve věku 1-20 let a zdravých kontrol (věk 1-17 let). Dále sledovali regulační kapacitu separovaných CD4⁺CD25⁺ Tregs na nespecificky, *in vitro* stimulovaných (PHA nebo přidání ozářených allogenních PBMC) buňkách periferní krve. Autoři našli nižší počty CD4⁺CD25⁺, ale ne NKT, buněk u sourozenců pacientů s T1D, kteří nesou rizikové HLA alely proT1D v porovnání s jedinci s méně rizikovými HLA alelami a kontrolní skupinou. Autoři diskutují možnost, že pokles regulačních CD4⁺CD25⁺ u geneticky predisponovaných jedinců přispívá ke klinické manifestaci T1D a tyto buňky mohou být cílem imunointervenčních, prevenčních postupů.

Třetí práce se zabývá obdobnou tematikou, ale s využitím lepší charakterizace CD4⁺CD25⁺ Tregs pomocí Foxp3 a CD127 znaků a specifické stimulace CD4⁺CD25⁺ Tregs *in vitro* autoantigeny T1D. Autoři potvrdili nižší frekvenci Tregs u přímých příbuzných pacientů s T1D,

kteří nesou rizikový HLA II genotyp, a to především po použití barvení na CD127 znak ($CD4^+CD25^+CD127^-$). In vitro stimulace autoantigeny T1D nevedla ke změně exprese Foxp3 a CD127 u $CD4^+CD25^+$ Tregs. Skupina příbuzných s rizikem T1D a defektem ($CD4^+CD25^+CD127^-$) Tregs vykazovala zvýšenou expresi IFN- γ (sekrece IFN- γ měřena FACSovou metodikou), především po stimulaci autoantigeny T1D. Největší rozdíl byl popsán po stimulaci peptidem insulinu. Autoři tedy prokázali defekt Tregs u přímých příbuzných pacientů s T1D, který může mít vliv na diabetogenní efektorové buňky.

Je pozitivní, že ve všech pracích byla provedena HLA typizace, a kde to umožňoval počet jedinců, byly skupiny dále definovány dle rizikových genetických kritérií. V mnohých předchozích studiích (a to i publikovaných ve špičkových časopisech v oboru) nebyla HLA typizace u kontrolních skupin provedena.

Z dalších tří prací, přiložených v této Ph.D. disertaci, je velmi přínosná publikace č. 2 (Bohmová K. et al. Scand. J. Immunol., 2007), která stanovila cytokinové profily buněk pupečníkové krve (nestimulované nebo stimulované autoantigeny beta buněk) u novorozenců z rodin diabetiků 1. typu v porovnání s rodinami bez autoimunitní zátěže. Tato data jsou unikátní, neboť studují stav s minimálním vlivem vnějšího prostředí.

Uvedené práce prošly standardním recenzním řízením, které zaručuje jejich kvalitu. K předloženým publikacím mám proto jen několik poznámek a dotazů.

1. Pospané změny cytokinových profilů metodou protein array doposud zahrnuly pouze malý vzorek jedinců. Kromě korelace s HLA a přítomností T1D autoprotilátek by bylo vhodné tyto studie rozšířit i o další „kontroly“ jako je porovnání s jinými autoimunitními onemocněními. Uvažuje autorka o porovnání např. rizikové populace T1D z různých, geograficky vzdálených lokalit, z vyspělých vs. rozvojových zemí, nebo jedinců, kteří prošli rozdílnými vakcinačními schématy (např. rotavirus)?
2. Efektorové buňky zodpovědné za destrukci beta buněk migrují do pankreatu. Podobně indukce regulačních imunitních odpovědí byla u zvířecích modelů nejlépe dokumentována ve slizničních uzlinách. Bylo by proto zajímavé doplnit charakteristiku sledovaných subpopulací Tregs (a NKT) v PBMC o expresi migračních receptorů pro slizniční kompartment (např. $\alpha 4\beta 7$ integrin, CD103).
3. Metody protein array stejně jako FACSová detekce subpopulací Tregs a jejich restimulace *in vitro* jsou dle mého názoru velmi náročné, drahé, a spíše nespecifické metody pro screening rizikových jedinců. Jak vidí tuto problematiku autorka? Popřípadě u jakých skupin (např. kombinace HLA a autoprotilátek) by o takovém přístupu uvažovala?
4. Jaké odlišnosti v cytokinových profilech nebo které Tregs považujete za nejzajímavější pro studium efektivity experimentálních imunointervenčních přístupů v prevenci nebo časně léčbě T1D?
5. V disertaci nejsou prezentovány nepublikované výsledky. Na jakém projektu - experimentech pracuje autorka v tomto roce?

Disertační práce je psána přehledně a srozumitelně, též po formální stránce je práce napsána pečlivě a zaslouhala by si tak dle mého názoru širší čtenářské fórum, než jakého se Ph.D. disertacím dostává. V úvodu je jistá disproporce mezi velmi široce a obecně pojatou první částí, která někdy zajde k přílišným zjednodušením (strany 6-7, 9); a částí o regulačních T buňkách, která je na vysoké odborné úrovni a jednotlivé aspekty problematiky jsou velmi přesně popsány. Vysoce

oceňují orientaci autorky v literatuře diabetu 1. typu a T regulačních buněk, což je velmi dobře patrné z citací klíčových publikací. Předložená disertace dokumentuje, že autorka si osvojila širokou škálu metodik, přičemž uvádí, které metodiky byly prováděny spoluautory. Disertační práce přináší nové a důležité poznatky. Výsledky jsou přehledně prezentovány a následná diskuse je vyvážená, napsaná v kontextu posledních poznatků v oboru - reflektuje tak i fakt, že Zuzana Vrabelová je prvním autorem dvou publikací a spoluautorem čtyř dalších. Předložená disertace jasně prokazuje schopnost samostatné vědecké práce autorky. Velmi kladně hodnotím, že v diskusi autorka zmiňuje i práce (např. Brusko TM et al., Diabetes, 2007), které přímo nepodporují její výsledky.

Pokud lze práci něco vytknout, pak je to nedostatečná zmínka o úloze faktorů prostředí v úvodní části. Ačkoliv experimentální práce autorky se faktory prostředí nezabývaly, jejich úloha v současném nárůstu manifestace diabetu 1. typu ve vyspělých zemích, a také v ovlivnění vývoje regulačních imunitních mechanismů je důležitá a mohla by být v úvodu podrobněji dokumentována. Bylo by též možné uvést více informací o neklasických APC, včetně např. zmínky o možné expresi MHC-II samotnými beta buňkami. V diskusi k obecné části lze pak najít poměrně zásadní tvrzení, že “už jednou zničené beta buňky však nemohou být z vlastních zdrojů obnoveny”. Osobně si myslím, že v biologických vědách je ošidné tvrdit, že “něco nejde”, přinejmenším bez definování za jakých podmínek. Regenerace beta buněk po klinické manifestaci onemocnění byla dokumentována u spontánního myšího modelu diabetu 1. typu (Kodama S et al., Science, 2003), a zdá se, že k ní může za určitých okolností dojít i u lidí (např. Martin-Pagola A et al., Diabetologia, 2008). Práce založené na “array” technikách vedou sice k získání velkého množství dat, mohou však skončit jako izolované “fishing expeditions”. Je proto velmi důležité, jak chce autorka na základě získaných výsledků pokračovat v dalších experimentech. I přes tyto malé připomínky považuji soubor předkládaných prací za velmi kvalitní.

Závěrem mohu konstatovat, že předložená práce přináší nové, původní výsledky z velmi aktuální a náročné oblasti klinického výzkumu diabetu 1. typu a splňuje všechny požadavky kladené na Ph.D. disertaci. Proto tuto disertační práci doporučuji k přijetí do oponentního řízení pro získání vědecké hodnosti Ph.D.

v Praze 3.10. 2008

MUDr. David P. Funda, Ph.D.
Sektor imunologie a gnotobiologie,
Mikrobiologický ústav, v.v.i., AV ČR, Praha