

Oponentský posudek

Název práce: *Diagnostický příspěvek k hodnocení intervenčních modelů léčby diabetu mellitu 1. typu*

Autor: Mgr. Klára Zacharovová Studijní program: **Doktorské studium biomedicíny** Studijní obor: **Biologie a patologie buňky**

Předložená práce je pečlivě a přehledně zpracovaná. Vzhledem ke značnému rozsahu témat a studií, autorka zvolila formu disertace jako komentovaný obsah publikovaných článků. V první části disertace se zabývá třemi tématy souvisejícími s transplantací Langerhansových ostrůvků; a v druhé části dvěma tématy, monitorováním autoimunitního procesu a sledováním efektu imunointervenční léčby antithymocytárním globulinem. Takto široce pojatá disertace a komplexní vzhledem k oboru se zakládá především na výsledcích publikovaných v sedmi publikacích, z nichž u dvou je kandidátka první autorkou, s impakt faktory 0,8 a 4. Také spoluautorské publikace vykazují impakt faktor až 5, přičemž kandidátka publikovala dalších 12 publikací na významná témata v diabetologii, celkem tedy publikovala 19 článků.

Předložená disertační práce se tedy zabývá vývojem metod, které by umožnily diagnostikovat efektivitu dvou léčebných postupů, především transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků a imunitní intervence v časném stádiu onemocnění u pacientů s diabetem 1. typu, tedy onemocněním s autoimunitní destrukcí beta buněk pankreatu. Autorka se zhostila svěřeného úkolu v rámci multioborového špičkového týmu na předním zdravotnickém pracovišti v ČR.

Nejprve se zabývala hodnocením efektu transplantace Langerhansových ostrůvků a vypracovala testovací metodiku pro jejich hodnocení založenou na měření jejich respirace. Dále se zabývala vizualizací transplantovaných Langerhansových ostrůvků pomocí superparamagnetických částic oxidů železa (SPIO částic) in vitro a in vivo. Izolované ostrůvky jsou tak před transplantací in vitro označovány SPIO kontrastní látkou. Po intraportální transplantaci jsou značené Langerhansovy ostrůvky v játrech zobrazovány na T2*-vážených snímcích magnetické rezonance. Autorka se zabývala prvotním značením kultivovaných Langerhansových ostrůvků, přičemž sledovala lokalizaci SPIO imunohistochemií, elektronovou mikroskopií v korelaci s magnetickou rezonancí po transplantaci do jater. Např. transmisní elektronovou mikroskopií SPIO částice byly zobrazeny jako silně elektrodenzní krystaly. Zjistila tak časovou závislost inkorporace SPIO do beta buněk izolovaných Langerhansových ostrůvků. Hlavním výsledkem bylo nejen, že transplantované ostrůvky zachovávají svou funkci, ale že SPIO jsou vedle makrofágů lokalizovány i v insulin-pozitivních buňkách ostrůvků transplantovaných do jater. V druhé publikaci přijaté do tisku v tomto roce autorka spolu s kolektivem řešili námitky, že po transplantaci se velká část SPIO částic translokuje ven z endokrinních buněk, což snižuje věrohodnost sledování Langerhansových ostrůvků po transplantaci. Autoři ukázali, že exkluze z beta buněk po týdnu od transplantace skutečně existuje, SPIO jsou však lokalizovány v makrofázích ve velmi blízkém okolí ostrůvků. V případě syngenní transplantace tato lokalizace přetrvávala jak u transplantace do kapsuly ledviny, tak do jater. Proces se ale lišil u alogenních transplantací do kapsuly ledviny a do jater. V prvním případě, akumulace SPIO v makrofázích neměla žádnou vypovídací hodnotu pro stav přežití transplantovaných ostrůvků, které

byly rejekcí eliminovány do 9 dnů. Naopak u jater, makrofágy se SPIO částicemi migrovaly vně z místa lokalizace transplantovaných ostrůvků a vymizely při rejekci ostrůvků. Díky tomuto mechanismu je možno rejekci Langerhansových ostrůvků po transplantaci do jater sledovat obdobným zobrazováním pomocí magnetické rezonance.

Třetím tématem první části bylo značení a zobrazení transplantovaných ostrůvků pomocí nové duální kontrastní látky na bázi nanočástic Perovskite Manganite pro magnetickou rezonanci i fluorescenční mikroskopii. Tato duální kontrastní látka je vyvíjena v rámci široké spolupráce mezi IKEM, PŘF UK, Ústavem anorganické chemie AVČR a ÚEM AVČR. Autorka přispěla k jejímu studiu pozorování životnosti Langerhansových ostrůvků při inkubaci s touto duální kontrastní látkou a zjistila její přítomnost v okrajových buňkách ostrůvků, především v endozomálních váčcích jak endokrinních buněk, tak makrofágů. Autorka uzavírá, že testovaná duální kontrastní látka je vhodná pro in vitro značení izolovaných pankreatických ostrůvků a neovlivňuje jejich kvalitu.

Ve druhé části se kandidátka zabývala sledováním buněčné autoreaktivity u pacientů s diabetem 1. typu a jejich příbuzných sledováním cytokinové odpovědi lymfocytů na specifickou stimulaci diabetogenními antigeny, tj. peptidy odvozenými od GAD 65, IA-2 a proinzulínu. Rozdíly v sekreci cytokinů mezi skupinami byly ale pozorovány v kultivaci bez stimulace, přičemž diabetici měli produkci cytokinů sniženou a takto byla snížena i produkce u kontrolní skupiny po stimulaci diabetogenními antigeny. Další publikace se zabývala přímo vlivem GAD 65 na sekreci cytokinů. Výsledky ukázaly nižší produkci Th1 cytokinů a vyšší produkci zánětlivých cytokinů u skupiny diabetiků.

V sedmé publikaci se autorka zabývala vlivem podávání anti-thymocytárního globulinu (ATG) NOD myším po manifestaci diabetu. Výsledkem byla zvýšená frekvence remisí u jedinců s glykemií <15.6 mM. Podávání ATG vedlo ke snížení poměru CD8+/CD4+ T-lymfocytů jak u splenocytů, tak u populace buněk pankreatických lymfatických uzlin. Autoři shrnují, že lepších výsledků by pravděpodobně mohlo být dosaženo u pre-diabetického modelu nebo při dlouhodobější terapii.

Závěrem lze konstatovat, že kandidátka si osvojila velmi široké spektrum metodik a zabývala se velmi širokým polem témat souvisejících s hodnocením intervenčních přístupů v léčbě diabetu mellitu 1. typu. Kriteria pro udělení hodnosti PhD splnila nejen počtem publikací, ale i jejich kvalitou v několika případech srovnatelnou s nejvyšší světovou úrovní. Navíc většinu svých publikací nezahrnula do tématu zpracované disertační práce. Proto je možno konstatovat, že kandidátka si plně zaslouhuje získat titul PhD.

RNDr. Lydie Plecítá, PhD., Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.