



Laboratoř buněčné a molekulární imunologie

Vedoucí: RNDr. Martin Bilej, DrSc.

Videňská 1083

142 20 Praha 4

Oponentský posudek na doktorskou dizertační práci

Studentka doktorského studijního programu v biomedicíně, obor imunologie MUDr. Marianna Durilová vypracovala dizertační práci „Cytokinová polarizace u imunopatologicky podmíněných chorob“ pod vedením školitelky Doc. MUDr. Kateřiny Štechové, PhD na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Předkládaná práce je tematicky rozsáhlá. Společným znakem uvedených prací je stanovení změn ve spektru cytokinů produkovaných krevními mononukleárními buňkami, které provázejí nástup autoimunitních onemocnění: diabetu 1. typu (T1D) a autoimunitní thyroditidy, a dále analýza cytokinů mateřského mléka ve vztahu k výskytu eosinofilní kolitidy u kojenců.

Předkládanou disertační práci tvoří šest publikací uveřejněných v mezinárodních odborných časopisech (s IF = 1.356 - 2.968). Autorka disertace je první autorkou jedné a spoluautorkou (v pořadí třetí a následující) dalších publikací, z nichž pátá a šestá na sebe úzce navazují. První dvě práce vznikly ve spolupráci se švédskou skupinou z Univerzity v Linköpingu. První je dlouhodobou studií, která přinesla zajímavé zjištění rozdílů v produkci cytokinů a chemokinů jedinců z rizikových skupin a pacientů s diabetem T1D, sledovaných od stanovení diagnózy v průběhu 2 let, a zdravých kontrol. U uvedených skupin izolovali mononukleární krevní buňky a sledovali spontánní a autoantigenem GAD65 a PHA stimulovanou produkci cytokinů. Ukázali, i přes značnou individuální variabilitu, že u jedinců v prediabetické fázi jsou dominantní spontánní i antigenem stimulované Th1 cytokiny (IFN- γ , TNF- α), zatímco u nově diagnostikovaných pacientů dochází s nástupem onemocnění k posunu k Th3/Tr1 cytokinům (TGF- β a IL-10) a současně i k prozánětlivé odpovědi, charakterizované nárůstem TNF- α a IL-6, MCP-1 a MIG produkce. Dlouhodobé sledování pacientů pak ukázalo, že značná část sledované reaktivity buněk zůstává v tomto období zachována.

Další studie prokázala výraznější Th1 cytokinovou odpověď (zejména produkci IFN- γ vyvolanou antigenem) u krevních buněk dětí otců s T1D a u matek s kompenzovaným onemocněním než u dětí matek s diabetem. Při hledání příčiny nižší buněčné odpovědi matek s T1D zjistili, že při kultivaci buněk pupečnickové krve vede zvýšená koncentrace glukózy v médiu (imitující mateřskou hyperglykémii, „maternal sweet“) ke snížení produkce Th1 cytokinů. Autoři se domnívají, že zvýšená koncentrace glukózy i autoimunitní prostředí se mohou podílet na mechanismech vedoucích k nižšímu výskytu onemocnění u dětí matek s T1D.

Úloha infekce při vzniku autoimunit je stále jedním z nosných témat při studiu autoimunitních onemocnění. Autoři testovali u pacientů s dalším onemocněním, autoimunitní thyroditidou, vliv infekčního agens *Helicobacterium pylori* (HP - který často kolonizuje gastrointestinální trakt) na profil cytokinů produkovaných krevními mononukleárními buňkami. Po stimulaci lyzátem HP a LPS zjistili u buněk jak zdravých, tak i nemocných, osídlených HP, masivnější produkci chemokinů. U skupiny nemocných pak i zvýšenou tvorbu prozánětlivých cytokinů, zejména IL-6. Zatímco buňky neosídlených kontrol, s nízkou bazální produkcí cytokinů i chemokinů, po stimulaci odpovídaly zvýšenou produkcí IFN- γ (Th1) i regulačního TGF- β . Cytokinové prostředí se tak může účastnit reakcí bránících vzniku chronické infekce a současně se podílet na prevenci vývoje autoimunitního onemocnění.

M. Durilová je první autorkou práce věnované analýze cytokinů v mateřském mléce a možnému vlivu jejich rozdílného složení na vývoj alergické, eosinofilní kolitidy (EC) u dětí. Z testovaného spektra cytokinů našli vyšší hladiny IFN- γ a naopak nižší hladiny IL-18 a regulačního TGF- β v mléce, které dostávali kojenci s EC, ve srovnání s mlékem zdravých kojenců. Výsledky naznačují, že rozdílné hladiny významných cytokinů (zvýšení Th-1) v mateřském mléce by mohly ovlivňovat časný vývoj imunity i možný nástup onemocnění u dětí.

Mezi důležité komponenty mateřského mléka patří i adiponektin, leptin a FABP, které řadíme mezi regulační hormony příjmu potravy a glukózo-lipidového metabolismu. Hladiny těchto molekul byly testovány od porodu v průběhu 12-ti měsíců laktačního období. V mléce naměřili počáteční pokles následovaný od 3. měsíce nárůstem koncentrací u adiponectinu, leptinu i FABP. Hladina adipofilinu (součásti tukových kapének) byla nejnižší v 1. a 12. měsíci laktace, korelace s výživovými parametry ani váhovým přírůstkem kojenců nebyla zjištěna.

Předložená disertační práce má klasické členění, obsahuje rozsáhlý teoretický úvod (s řadou přehledných obrázků a tabulek), následovaný relativně krátkým výčtem některých použitých metod. Experimentální část je věnována jednotlivým publikacím, které jsou uvedeny jasně definovaným cílem práce, nástinem použitých metod, stručným a jasným shrnutím hlavních výsledků a rozsáhlejší diskusí. Následuje seznam použité literatury a přiložené kopie publikací. Prezentované

práce jsou jasným příkladem výzkumu v oblasti klinické imunologie a dokládají účelné a přínosné zapojení pracoviště do domácí a mezinárodní spolupráce. Práce však obsahuje řadu překlepů (thymus x tymus, antagonickou, ochranní účinek, prožívání eozinofilů apod.) a v Úvodu, snad díky jeho rozsáhlosti, i určité nepřesnosti (např. str. 34, popis imunologické ignorance..).


Na autorku práce mám následující dotazy:

- 1) Z uvedených informací není zcela jasný podíl autorky disertace na získávání a interpretaci experimentálních výsledků. Můžete uvést, které imunologické metody jste zvládla a jak jste se podílela na zpracování dat a sepisování publikací?
- 2) Pokud zhodnotíte výsledky v první publikaci nejen jako „scattered“ diagramy, ale stanovíte počty pacientů nad prahovou (cut-off) hodnotou jednotlivých testů, jaký podíl nebo procento pozitivních výsledků získáte? Jak to ovlivní interpretaci získaných výsledků?
- 3) Jak vysvětlíte stimulaci PHA u rizikové skupiny sledovanou produkcí IL-5 a TNF- α ? Porovnejte hodnoty těchto cytokinů u jednotlivých skupin.
- 4) Vzhledem k době, která uplynula od publikování výsledků (u prací z roku 2009) máte možnost porovnat intenzitu odpovědi na specifický autoantigen s nástupem onemocnění?

Disertační práce obsahuje šest publikací, z toho jednu prvoautorskou. Práce přináší řadu původních výsledků, které jsou příkladem klinicky orientovaného výzkumu v oboru imunologie a byly publikovány v impaktovaných, zahraničních časopisech.

Závěrem lze shrnout, že předložená práce splňuje požadavky kladené na doktorskou disertační práci a může být postoupena k oponentnímu řízení pro získání vědecké hodnosti PhD.

V Praze dne 7. 5. 2014


Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc.
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i
Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4