

Oponentský posudek na diplomovou práci

Mechanismy imunoregulačního působení B lymfocytů produkujících IL-10 v závislosti na cytokinovém prostředí

Jméno autorky: Bc. Pavla Boháčová
Oponent: Prof. MUDr. Ilja Stríž, CSc.

Práce se zabývá aktuální problematikou B regulačních buněk (Bregs) a na myším modelu charakterizuje vliv stimulace pomocí LPS a vybraných cytokinů na jejich indukci a funkční aktivitu (proliferace T lymfocytů, ovlivnění makrofágů). Práce má logické členění, v literárním úvodu se věnuje nejednotné fenotypové charakterizaci myších i lidských Bregs a jejich diferenciaci. Značná část úvodní části je věnována mechanismům působení Bregs prostřednictvím produkovaných cytokinů IL-10, TGF beta a IL-35 nebo prostřednictvím membránových molekul (FASL, PD-L1 a PD-L2, TRAIL, GITRL, CD72, CD39 a CD73). V závěru literárního úvodu jsou vymezeny možnosti indukce Bregs in vitro a v experimentech využívajících myších modelů.

Metodická část práce je sepsána přehledně, jsou zde detailně podány informace o kultivačních a separačních podmínkách, principy proliferačních testů a hodnocení fenotypu průtokovou cytometrií nebo mikroskopii. Popsána je dále metodika ELISA k detekci cytokinů, metodika RT-PCR, testování proliferační aktivity a vymezeny také použité statistické metody.

Výsledky ukázaly, že k nejvýraznější indukci IL-10 v separovaných B lymfocytech dochází vlivem LPS, ke zvýšení tvorby však došlo i vlivem IL-6, IFN gama, IL-4 a IL-21, bez efektu byly TGF beta a IL-12. Procento IL-10 pozitivních buněk bylo vyšší při současné kostimulaci pomocí LPS a IL-12 nebo IFN gama. Imunofenotypizace ukázala, že v přítomnosti LPS cytokiny IL-21 a IFN gama zvyšují a TGF beta snižuje zastoupení B1 buněk s opačným trendem v zastoupení B2 buněk. IFN gama při stimulaci LPS snižuje a TGF beta zvyšuje procento CD5+CD1d+ B lymfocytů. IFN gama byl jediným cytokinem, který indukoval v B lymfocytech expresi genů pro FasL a PD-L1, proliferace B lymfocytů byla kromě LPS nejvíce zvýšena kultivací s IL-4. Studie mezibuněčných interakcí prokázaly, že peritoneální makrofágy (adherentní buňky) ovlivněné Bregs měly potlačenou schopnost indukovat proliferaci aktivovaných CD8+ T lymfocytů. Tyto makrofágy měly také schopnost v T lymfocytech potlačit sekreci IL-17. Při analýze mechanismů mezibuněčných interakcí bylo zjištěno, že peritoneální makrofágy ovlivněné B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 a IFN gama mají sníženou expresi CD86, vlivem TGF beta dochází naopak k indukci. Exprese CD80 ovlivněna nebyla. B lymfocyty stimulované LPS v přítomnosti IL-12 a IFN gamma pak mají schopnost potlačit v peritoneálních adherentních buňkách tvorbu IL-6, k indukci dochází působením B buněk ovlivněných pomocí IL-21. V případě ovlivnění pomocí IL-21 byl zjištěn statisticky nevýznamný trend v indukci genu pro IL-1alfa.

V diskusi jsou získané výsledky adekvátně shrnuty a dány do souvislosti s publikovanými studiemi.

Závěr: Jedná se o velmi pěknou práci, studentka využívá pestrou paletu imunologických metodik, je kvalitní i z formálního hlediska (nenalezl jsem ani jeden překlep či gramatickou chybu), grafy jsou přehledné, text srozumitelný. K práci nemám závažné připomínky a doporučuji ji k obhajobě se stupněm „výborně“.

Dotazy:

1. V úvodu je zmíněno (str.12), že „Bregs mohou potlačovat protinádorovou imunitou prostřednictvím produkce TNF alfa (Schioppa et al. 2011). Jakým způsobem k tomu dochází? Tento cytokin je zpravidla spojován spíše s likvidací nádorových buněk.
2. Bylo prokázáno, že by se IL-35 účastnil tlumení imunitní odpovědi také u člověka?
3. Čím si vysvětlíte skutečnost, že IL-12 zvyšuje u LPS stimulovaných B lymfocytů procento IL-10 produkujících buněk, ale neovlivňuje signifikantně tvorbu IL-10?
4. Proč byla sledována genová exprese právě u IL-1 alfa a ne IL-1 beta, který je více studovaným prozánětlivým cytokinem této rodiny.

V Praze 2.9. 2015

Prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.
Pracoviště klinické a transplantační imunologie IKEM