

Posudek doktorské dizertační práce

Autor: MUDr. Adam Kloperk

Název: Adaptive immune system in patients with primary immunodeficiencies

Doktorský studijní program: Imunologie

Pracoviště: Ústav imunologie, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Anna Šedivá, DSc

Mechanismy uplatňující se přímo nebo nepřímo v patogenezi imunodeficitních chorob jsou jedním z významných aktuálních témat výzkumu v oblasti klinické imunologie, do tohoto výzkumu významně zasahuje Ústav imunologie 2.LF UK. Předložená práce Dr Kloperka plně zapadá do výzkumného kontextu uvedeného pracoviště a rozhodně ji lze považovat za vysoce aktuální. Většina dat byla získána na uvedeném pracovišti, částečně jsou uvedeny výsledky získané během pobytu Dr Kloperka na Center for Chronic Immunodeficiency, Medical Center – University of Freiburg, což je špičkové pracoviště ve výzkumu primárních imunodeficiencí.

Z problematiky primárních imunodeficiencí jsou teze zaměřeny na vrozený deficit T-lymfocytárního systému – syndrom DiGeorgre. Práce je koncipována jako soubor tří již publikovaných článků v kvalitních impaktovaných časopisech (IF 4,7 – 3,5 v roce 2018).

Těmto článkům předchází teoretický úvod zaměřený jak na patogenetické aspekty syndromu DiGeorge, tak na vlastnosti a význam buněčných subpopulací, jež byly následně u nemocných se syndromem DiGeorge zkoumány. Úvodní všeobecná kapitola má 48 stran, včetně literatury. Je doplněna 3 obrázky. Hlavní použitou metodikou byla průtoková cytometrie, pomocí níž se autor zaměřil na výzkum některých lymfocytárních subpopulací. Jednotlivé publikované články se dobře doplňují a vytvářejí

ucelenou práci zabývající se některými buněčnými subpopulacemi u nemocných se syndromem DiGeorge.

Celá práce napsána anglicky, k angličtině nemám žádné připomínky.

V jednotlivých článcích se Dr. Klopper zaměřil na:

1. Význam regulačních T-lymfocytů u nemocných s DiGeorge syndromem, zejména Treg lymfocytů s expresí antigenu Helios – mělo by se jednat o Treg které pocházejí doopravdy z thymu (nTreg), nevyvíjejí se na periférii (pTreg). Výsledkem bylo zjištění, že ačkoliv je absolutní počet Treg u nemocných se syndromem DiGeorge snížen, jejich procentuální zastoupení v subpopulaci CD3+ lymfocytů se neliší od kontrolních osob. Toto pozorování platí pro Helios+ lymfocyty.
2. Druhá práce se zabývá B-lymfocyty u nemocných s DiGeorge syndromem se zaměřením na lymfocyty marginální zóny. Autoři potvrdili dřívější pozorování o zvýšení počtu naivních B-lymfocytů a snížení počtu paměťových B-lymfocytů. Podle jejich vlastního pozorování byl snížen i počet "marginal zone-like" lymfocytů, s tím částečně koresponduje i snížení hladin přirozených protilátek namířených proti antigenu alfa-GAL. Byla zvýšena i hladina cytokinu BAFF. Trochu překvapivé je pozorování o tendenci pacientů k hypergamaglobulinemii, syndrom DiGeorge bývá spíše spojován s hypogamaglobulinémií u některých pacientů. Je zřejmé, že toto v literatuře opakované spojení se týká pouze minority pacientů, u většiny z nich je ale zřejmě situace opačná.
3. Poslední práce se týká „follicular helper cells“. Tato subpopulace byla u pacientů se syndromem DiGeorge zvýšena ve srovnání s kontrolními osobami, ale oproti kontrolním, osobám nebyl pozorován vzestup počtu těchto buněk s postupujícím věkem. Expres (aktivačních) znaků PD1 a ICOS na těchto buňkách nebyla rozdílná oproti kontrolní populaci, ale v prvních 5 letech bylo možno zaznamenat pokles exprese PD1 u DiGeorge pacientů, u kontrolních osob nebyl podobný pokles signifikantní. Abnormality follicular helper cells u pacientů s DiGeorge syndromem nekorelovaly s přítomností autoimunity, i když počet vyšetřených nemocných byl poměrně nízký (17).

K práci mám tyto připomínky:

Na straně 14 autor zdůrazňuje pře podle Evropské společnosti pro imunodeficiencie (ESID) je jedinou podmínkou stanovení diagnózy snížení počtu C3+ lymfocytů, zatímco průkaz del 22q11.2 je pouze podpůrným kritériem (bohužel zcela chybí citace). Je třeba říci, že kritéria, které autor pravděpodobně

myslí (ESID and PAGID criteria, Conley et al 1999) nepovažují genetické vyšetření za podpůrné kritérium ale za jedno ze 3 kritérií, splněny musí být 2/3 těchto kritérií. Dle kritéria ESID registry, časopisecky publikovaná počátkem tohoto roku, dostupné na PUBMED cca od ledna (Seidel MG, et al. J Allergy Clin Immunol Pract. 2019) považují průkaz del22q11.2 za jeden ze 2 základních předpokladů diagnózy (druhým je klinický imunodeficit). To je jistě problém definicí, přesto autor ve všech svých článcích píše, že diagnóza DiGeorge syndromu byla potvrzena právě genetickým vyšetřením. Nic se nikde nepíše o klinické manifestaci a např. podle obr 1 článku č 1. velká část pacientů nesplňovala požadavek poklesu počtu CD3+ lymfocytů pod 1500/mm³. Pokud počítám správně, tuto podmínku nesplňuje 6/17 pacientů v Tab. 1 ve článku č 3! Pokud uvedení pacienti doopravdy splňovali požadavek na klinický imunodeficit (není nikde rozebráno, uvedeno), splňují kritéria ESID registry, ne však ESID/PAGID. Vše je ale v rozporu s tvrzením autora z jeho vlastního úvodu.

Druhý problém mám v článku č. 2, kde jsou naivní buňky definovány jako CD19+CD27+,IgD+. V metodice se mi ale nepodařilo nalézt, jak byl povrchový IgD stanovován, píše se pouze o stanovení povrchového IgM.

K autorovi mám tyto dotazy:

V naší laboratoři sledujeme často obdobné znaky, které sledoval autor ve své práci, k vyšetření ale používáme plnou (lyzovanou) krev, bez izolace na hustotním gradientu. Může autor srovnat výhody obou postupů. Izolace PBMC na hustotním gradientu je evidentně pracovně i časově náročnější a poměrně obtížná v rutinním provozu.

Všechna pozorování autora se týkají pacientů mladších 20 let. Přesto, v současné době se nemocní s DiGeorge syndromem dožívají dospělosti. Kromě toho i plodí děti, proto někteří z našich starších nemocných byli diagnostikováni až v souvislosti s vyšetřením dítěte trpících DiGeorge syndromem. Mají autoři k dispozici nějaká data týkající se starší populace s del22q11.2?

Může autor podrobněji spekulovat o významu změn exprese PC1 s postupujícím věkem u nemocných s DiGeorge syndromem a možná i u zdravých kontrol v prvních letech věku? Jedná se "pouze" o výraz aktivace FHC, nebo mají tyto změny hlubší regulační význam, který by bylo možno prokázat např. u větší počtu vyšetřených nemocných?

Celkově hodnotím dizertační práci Dr Klocperka velmi pozitivně, přinesla nové poznatky, které již byly mezinárodně uznány publikací ve velmi kvalitních časopisech. Autor jednoznačně prokázal svou schopnost samostatné vědecké práce.

Po důkladném prostudování disertační práce MUDr. Klocperka jsem došel k závěru, že splňuje podmínky podle §47 VŠ zákona 111/98 Sb. a doporučuji tuto práci k obhajobě vedoucí k udělení titulu PhD.

V Brně 25. 7. 2019

Prof. MUDr. Jiří Litzman, CSc.

Ústav klinické imunologie a alergologie

LF MU a FN u sv. Anny v Brně