

Oponentský posudek dizertační práce

Imunitní systém u pacientů s cystickou fibrózou

MUDr. Jitka Brázová

Popis a formální podoba práce:

Vlastní práce má 68 stran, 6 kapitol, z toho 2 obecné, ve 4 jsou popsány a rozebrány výsledky vlastních výzkumů.

Práce je podpořena 293 citacemi.

Přílohou jsou 4 publikace v plném znění, původní články otištěné v renomovaných časopisech s IF (Clinical Immunology- 2 články, Microbes and Infection, Vaccine), dva z nich mají IF nad 3, jeden nad 2. Autorka je 2x prvním autorem, 2x spoluautorem.

V příloze je i seznam publikací k tématu:

Publikace: 4 články v časopisech s IF (jsou v příloze), 3 články v ČR, spoluautorka monografie, článek v Alergii- cena za nejlepší původní práci roku 2004

Přednášky: 16 prezentací k tématu, zahraničních kongresů celkem 13, z toho první autorkou 9x, 3 domácí kongresy, ve všech případech první autorkou

Formálně má práce přehledné členění, zkratky uvedené v přehledu (pouze chybí zkratka NBD1, která je pak použita v úvodu a chybí použité zkratky aminokyselin). Ilustrace, tabulky a schémata jsou velmi pěkná, srozumitelná, kvalitně provedená.

Rozbor práce po jednotlivých kapitolách:

1. Úvod

Úvod je přehledný, s vhodnými a vysvětlujícími ilustracemi, podává základní informace o problematice.

2. Imunitní systém u CF

V kapitole jsou popsány základní imunitní mechanismy u CF. V podkapitolách jsou rozebrány jednotlivé složky imunity a popsána jejich alterace u CF.

Důraz je vložen na poruchu mechanických, chemických a fyzikálních vlastností epitelové bariéry u CF a sekundární poruchy imunity vrozené. Dále jsou pak popsány specifické změny získané imunitní odpovědi u CF.

3. Zkoumání imunitního systému CF pacientů na vlastním souboru

Autoři zkoumali hlavní parametry humorální a buněčné imunity včetně autoprotilátek v souboru pacientů s CF. Nebyla zjištěna žádná primární porucha imunity, pouze přechodná hypogamaglobulinémie IgG2 v prvních letech. Ostatní změny jsou sekundární. Nejvýraznější z těchto změn je hypergamaglobulinémie ve vyšším věku- znamená horší průběh plicního onemocnění a chronický neutrofilní zánět v plicích. Autoři potvrdili také zvýšený výskyt pozitivitu ANCA-BPI u CF, což by mohlo zhoršovat neutralizační funkci BPI (neutralizuje bakteriální LPS). Ve skupině CF dětí s ANCA+ a sníženým IgG2 nalezena podskupina neschopná adekvátně reagovat na stimulaci sekrecí IL-4 a IFN gamma- měli významnější zhoršení plicních funkcí.

4. Korelace genotypu s fenotypem- vliv genetických modifikátorů na průběh onemocnění

Autoka zde uvádí potenciální genetické a negenetické modifikující faktory obrazu CF. Popsáno je vlastní pozorování vlivu genových polymorfismů TGF beta na fenotyp CF. Viz článek v příloze

V dalším se zmiňuje MUDr. Brázová o významu polymorfismů genu pro MBL u CF. Ve vlastní studii u CF pacientů nezjistila rozdíly ve frekvenci polymorfismů oproti kontrolní skupině. Sérová koncentrace MBL silně korelovala s polymorfismem MBL2 genu, ale genový polymorfismus MBL nebyl v korelaci s respiračním fenotypem CF.

Z dalších modifikátorů průběhu CF byl uveden SP-D. Doplněno vlastním pozorováním, kdy autoři potvrdili nižší produkci SP-D v BAL u CF v porovnání s kontrolami. Hladina SP-D inverzně korelovala s tíží plicního poškození daného množstvím PMN. Autoři proto navrhuji jako řešení terapeutické podávání SP-D.

Dále jako modifikátor zmíněn LTB-4. Ve vlastní studii autorka popisuje efekt suplementace n-3 PUFA, kdy po podání n-3 PUFA došlo k poklesu koncentrace LTB4 v KVV, výsledky svědčí pro ovlivnění neutrofilního zánětu v plicích.

5. Studium interakce infekce a imunitního systému u CF

Autorka popisuje roli dendritických buněk (DC) jako významných antigen prezentujících buněk, jejich maturaci po setkání s antigenem a následnou interakci s lymfocyty.

Dále jsou popsány 2 hlavní bakterie, které modifikují a komplikují klinický obraz respiračního postižení u CF, a to Burkholderia cepacia (Bc) a Pseudomonas aeruginosa (Pa). V kapitole je rozebrán mechanismus časně a pozdní kolonizace a infekce Pa a faktory, které vedou k rezistenci bakterie na pokusy o eliminaci. Dále pak jsou popsány diagnostické metody s důrazem na pokud možno časnou diagnostiku kolonizace Pa, kdy léčba ještě může patogen eliminovat.

Ve vlastním pozorování autorka testovala, jakým způsobem jsou DC ovlivňovány bakteriálními imunomodulátory (publikace Vaccine, Alergie).

V dalším odstavci je pak popsána role TLR ve spuštění signalizační kaskády, iniciaci imunitní odpovědi a mobilizaci obranných mechanismů. Zdůrazněna je škodlivost přemrštěné systémové zánětlivé odpovědi. Možnost zbrzdění zánětlivé reakce na úrovni TLR je dána alternativním sestřihem při transkripci mRNA TLR, jsou zmíněny inhibiční účinky splicing variant některých molekul ze signální dráhy TLR

Ve vlastní studii pak autoři zmapovali kinetiku exprese jednotlivých transkripčních (sestřihových) variant lidského TLR4 u monocytů a DC- publikace- Microbes and Infection.

6. Diagnostická aplikace v klinice- protilátky proti P. aeruginosa

V kapitole je popsán pozitivní vliv časně zahájené antibiotické léčby zaměřené proti Pa na přežití pacientů s CF. V tomto kontextu je zmíněn význam serologické diagnostiky Pa infekce, kdy je v některých zemích zahajována ATB terapie již při serologických známkách infekce.

Ve vlastním pozorování jsou pak porovnány jednotlivé metody pro detekci kolonizace/infekce Pa a Bc- serologie, PCR, kultivace. Metoda PCR výhodná pro identifikaci Bc, ale nespolehlivá pro Pa, a to pro falešnou pozitivitu, ale i negativitu. V případě Pa – důležitá mikrobiologická surveillance a 1 měsíc, doplněná vyšetřením PL.

7. Závěr

V závěrečném odstavci jsou pak shrnuty výše uvedené výsledky vlastního pozorování

Přílohy- články:

1. Brazova J, Sismova K, Vavrova V, Bartosova J, Macek M, Laushmann H, Sediva A. Polymorphisms of TGF-beta1 in cystic fibrosis patients. Clinical Immunology 2006;121:350-357

Hypotéza: Práce se zabývá polymorfismem TGF beta 1 (cdn10, 25) u pacientů s CF ve srovnání se zdravými kontrolami a rolí polymorfismu v klinickém obraze CF. TGF beta 1 zvolen jako možný genetický modifikátor fenotypu CF- jako profibrotický cytokin.

Soubor: Počet pac 118, 268 kontrol- splňují H-W equilibrium

Metody: genotypizace- PCR-ARMS, hladiny TGF ELISA po stimulaci LPS a PHA

Výsledky: TGF 1 beta TT(cdn10)GG(cdn25)- vyšší zastoupení u pacientů s jaterním postižením a diabetem. Produkce TGF beta 1 byla vyšší u CF pacientů (hlavně s chronickou kolonizací Pa, zhoršením plicních funkcí a horší nutricí) než u kontrol, nezávisle na genotypu s výjimkou pacientů s Bc komplex kolonizací- zde byly velmi nízké hodnoty. Velmi vysoké a velmi nízké hodnoty spjaté u CF se zhoršením plicních funkcí.

2. Brazova J, Sediva A., Pospisilova D, Vavrova V., Pohunek P, Macek M, Bartunkova J, Lauschmann H. Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis. Clinical Immunology 2005;115:210-215

Hypotéza: potenciální role nerovnováhy T_H1 a T_H2 cytokinů u pacientů s CF s předpokládanou T_H2 dominancí.

Soubor: 48 CF, 16 kontrol, soubory vyhovovaly H-W equilibrium

Metoda: Měřeny hladiny IFN-gamma, IL-4 a IL-10 v supernatantech plné krve po stimulaci LPS+PHA- ELISA, sledování klinických a funkčních parametrů, ANCA BPI, ANCA PR3- ELISA, Ig- nefelometrie

Dle výsledků: 2 skupiny: 1. „low responders, 2. „high responders“

Výsledky: 1. skupina měla výraznější průměrný pokles FEV1 za 3 roky, 10 z 16 pacientů měli chronickou infekci Pa (oproti 2. skupině, kde pouze 13 z 32). Posun k T_H2 typu cytokinového spektra byl pouze ve 2. skupině, a to u těch pacientů, kteří byli kolonizováni Pa- zvýšen IL-4 a ANCA.

Závěr: T_H2 imunitní odpověď je spojena s chronickou infekcí Pa, ale jen ve skupině high-responders

3. Jarešová I, Rožková D., Špišek R., Janda A., Brázová J., Šedivá A. Kinetics of toll-like receptor-4 splice variants expression in lipopolysaccharide-stimulated antigen presenting cells of healthy donors and patients with cystic fibrosis. Microbes and Infection 2007;9:1359-1367

Hypotéza: sestřihové varianty TLR u myši mají inhibiční funkci. Obdobné sestřihové varianty očekávány i v souboru CF pacientů a zdravých kontrol. Testováno, zda jsou sestřihové varianty zastoupeny stejně u CF pacientů i kontrol a zda je stejná kinetika transkripce TLR.

Soubory: pacienti 9 a 9 kontrol splňujících H-W equilibrium

Metody: identifikovány 4 sestřihové varianty TLR 4- metoda RT-PCR pro identifikaci transkriptů, PCR produkty vloženy do vektorů- plasmidy E.coli- analýza inkorporace sekvencí- sekvenátor, v supernatantu identifikovány TNFalfa a IL-8 ELISA v průběhu 24 hodin

Výsledky: Expres TLR4 NM 003266 sestřihové varianty vyšší u zdravých než u CF. Produkce TNF alfa vyšší u CF.

Závěr: U CF je TLR4 exprese konstantní, expozice G- bakt. tuto situaci nemění. U pacientů s CF redukována schopnost zvýšit transkript 003266 a je patrný pomalý vzestup TLR4. Zvýšena produkce TNF po stimulaci LPS u CF- vysvětleno tím, že je snížena potenciálně

inhibiční varianta NM 00326, tím je pak zvýšena odpověď na TLR stimulaci- podpořeno zvýšením aktivace NFkappa B u LPS stimulovaných buněk u CF.

4. Spisek R, Brazova J, Rozkova D, Zapletalova K, Sediva A, Bartunkova J. Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators. Vaccine 2004;22:2761-2768

Hypotéza: DC vyžívají a stávají se funkčními po aktivaci, sledován imunostimulační efekt imunomodulátorů- Luivac, Biostim, Ribomunyl, Imudon, Bronchovaxom

Metody: Nezralé DC izolovány z monocytů kultivovaných s GM-CSF a IL-4. 5. den expozice- Luivac, Biostim, Imudon, Broncho-vaxom, Ribomunyl, Biostim. Fenotyp a funkční vlastnosti 48 hodin po ošetření- FACS- CD40, CD80, HLA-DR, CD14, CD83, CD86, ALA-ABC. Po 48 hodinách odebrán supernatant z buněčných kultur- analýzy p70 IL-12 a IL-10-ELISA. FITC-dextran endocytosa- inkubace, pak analýza FACS. Směsná reakce lymfocytů- MLR- izolace CD4+, aktivované DC kultivovány s CD4+ T LY od alogenního dárce. Proliferace alogenních T LY určována 4. den- vychytáváním 3^H tymidinu

Výsledky: fenotypové změny 48 hodin po stimulaci imunomodulací (Luivac, Biostim, Ribomunyl): zvýšení povrchové exprese kostimulačních molekul (CD80, B8, 40), molekul spojených s maturací (CD83) a APC (HLA-ABC, HLA-DR), stupeň aktivace odpovídal aktivaci indukované LPS a Poly (I:C)- nebylo pozorované pro Imudon a Bronchovaxom sledování viability FACS (PI barvení)- stimulace LPS nebo Poly (I:C)- 20-30% buněk pak nebylo viabilních, ale aktivace Luivacem, Biostimem a Ribomunylem nevedla k signifikantní ztrátě buněk- 80-100% živých (/tzn ztráta 0-20%). Fagocytóza DC po proliferaci: DC ošetřené léky způsobujícími fenotypové vyžívání- Luivac, Biostim, Ribomunyl- nižší vychytávání v porovnání s Imudonem, Bronchovaxomem a nezralými DC

Závěr: Aktivace alogenních CD4+ T LY DC stimulovanými Luivacem, Biostimem a Ribomunylem výraznější než nezralými DC nebo DC ošetřenými LPS nebo Poly (I:C). Imudon a Bronchovaxom indukovaly hůře aktivační potenciál a proliferační odpověď DC a prakticky se tyto DC nelišily od nezralých, neošetřených. Luivac indukoval IL-12 a snižoval produkci IL-10 (podobně Biostim), ostatní méně.

Otázky k úvodní textové části s vlastními pozorováními:

1. Jaký má autorka názor na mechanismus účinku aminoglykosidů při korekci nonsense mutace G542X (alternativní sestřih?). Je možné dlouhodobě aminoglykosidy podávat a v jaké formě? Je známo, zda se váží pouze na oblast genu pro CFTR nebo mohou ovlivnit splicing i jiných genů?
2. Jak vysvětlíte výskyt ANCA BPI autoprotilátek u CF?
3. Souvisí opravdu TGF beta polymorfismy s průběhem onemocnění u CF, ovlivňují plicní morfologii (profibrotický cytokin) nebo jen funkční parametry?
4. Jak si vysvětlujete chybění podtřídy IgG2 v prvních letech života u pacientů s CF, má podle Vašeho názoru vliv na pozdější kolonizaci Pa? Je vhodné tento nedostatek korigovat substituací imunoglobulinů?
5. Jak vysvětlíte rozpor mezi Vašimi výsledky stran ovlivnění produkce TGF beta 1 jeho genovými polymorfizmy a závěry Drumma? Jak si vysvětlíte sníženou produkci TGF beta 1 u pacientů kolonizovaných B cepacia, jde o jev primární, tudíž, že jsou TGF

beta 1 deficientní pacienti kolonizováni snáze Bc, nebo Bc sekundárně interaguje s imunitním systémem a snižuje produkci TGF beta 1?

6. Jak si vysvětlujete fakt, že živé bakterie nejsou schopny plnohodnotné aktivace nezralých DC ve srovnání s usmrcenými?
7. Pokud protilátky proti Pa mohou být při chronické infekci i negativní, jak se tedy mohu spolehnout na titry protilátek při monitoraci míry kolonizace/infekce PA? Negativizace PL přece může znamenat i anergii a tudíž horší prognózu.
8. Proč je rozpor s uváděnými literárními údaji v sensitivitě protilátek proti jednotlivým antigenům Pa? Vy shledáváte stran sensitivity nejlepší PL proti exotoxinu a ne proti alkalické proteáze.

Otázky k článkům, číslováno dle pořadí uvedených článků:

1. Jak si vysvětlujete zvýšenou produkci TGF beta u Pa kolonizace a naproti tomu nízkou u kolonizace Bc? Proč jste zvolili jako genový modifikátor průběhu CF právě TGF beta? Fibróza není přece dominantním znakem CF.
2. Nebyla přece jen i při mizivých hladinách cytokinů ve skupině „low responders“ převaha jednoho z cytokinů? Liší se high a low producers kolonizovaní Pa dobou kolonizace Pa? Přepis?- ANCA pozitivita 13 z 48- 8 BPI, 4 PR3- jakou ANCA měl ten poslední?
3. Čím je dáno, že u CF se v menší míře objevuje sestřih inhibiční varianty TLR4?
4. Jak si vysvětlujete rozdílný efekt bakteriálních imunomodulátorů??

Závěrečné hodnocení práce:

Formálně je práce zpracována velmi dobře, nelze jí nic podstatného vytknout. Téma a zadání práce je zpracováno přehledně a fakta jsou podložena nejen řadou citací, ale i výsledky vlastního výzkumu v daných oblastech. Shoda či případné neshody se světovými údaji a výsledky studií z jiných center jsou dobře oddiskutovány.

Co se týká vlastních publikací, pak paní doktorka Brázová splňuje požadavky jak kvantitativní, tak kvalitativní. Publikace, které jsou pak v příloze, byly otištěny ve význačných periodických. Výše jsem rozebrala jednotlivé články podrobně, vesměs jsou dobře definované pracovní hypotézy, metody jsou dobře zvolené, výsledky srozumitelně interpretované a diskutované v kontextu se závěry jiných studií.

První článek na poměrně početném souboru pacientů s CF prokazuje, že výskyt polymorfismů TGF beta 1 u pacientů s CF se v různých populacích může lišit (neshoda se závěry Drumm a spol), shoda s výsledky Arkwrighta a spol. naopak podporuje hypotézu o roli produkce TGF beta 1 v patogeneze jaterního postižení a endokrinní lézi pankreatu u CF (fibrosa jater- vyšší výskyt u pacientů se zvýšenými hladinami TGF beta 1). Zajímavý a dosud nepublikovaný je údaj o snížené produkci TGF beta 1 u Bc kolonizace respiračního traktu CF pacientů.

Ve druhém článku, který se zabýval produkcí cytokinů ve snaze podpořit hypotézu o T_H2 profilaci imunitního systému u CF autoři došli k zajímavému závěru, že stran kolonizace respiračního traktu a jejího vlivu na pokles plicních funkcí je spíše riziková anergie imunitního systému než T_H2 směřovaná imunitní odpověď, což je zajímavým a novým poznatkem.

Stran vědeckého přínosu mě nejvíce zaujal článek o sestřihových variantách TLR4 u CF a zdravých kontrol (3. článek), který považuji za velmi kvalitní a přínosný nejen závěry, ale i přínosem metodologickým.

Ve čtvrtém článku je pak rozebrána kvalitně metodika přípravy dendritických buněk a jejich stimulace fyziologickými koncentracemi bakteriálních imunomodulátorů s překvapivým závěrem, že jednotlivé imunomodulátory se mezi sebou významně liší v míře stimulace vyžívání dendritických buněk a tím jejich schopnosti účinně zpracovávat a prezentovat antigeny a stimulovat lymfocyty.

Celkově považuji práci za velmi kvalitní jak formálně, tak vědecky s nepochybným přínosem pro rozvoj v oblasti výzkumu imunitního systému u CF. Dále pak věřím, že paní doktorka Brázová má předpoklady k další samostatné tvořivé vědecké práci.

Na základě tohoto soudím, že paní doktorka Jitka Brázová svou prací prokázala, že splňuje předpoklady pro udělení vědecké hodnosti doktora a titulu Ph.D za jménem.