

Oponentský posudek dizertační práce

Název práce: Mechanizmy patogeneze experimentální autoimunitní uveitidy a možnosti jejich ovlivnění

Studentka doktorského studia: MUDr. Aneta Klímová

Studijní program biologie a patologie buňky na 1. lékařské fakultě UK v Praze

Cílem dizertační práce bylo zavedení reprodukovatelného modelu experimentální autoimunitní uveitidy (EAU) u myši v České republice a dále na tomto modelu sledovat zastoupení CD3⁺ a F4/80⁺ buněk v sítnici, zhodnotit vliv mikrobiálního prostředí na intenzitu nitroočního zánětu a testovat terapeutické možnosti. Současně s cílem dizertace byly stanoveny 4 hypotézy, které usměrnily experimentální práci a vnesly do získaných výsledků systém.

Předložená dizertační práce má 90 stran textu včetně 101 literárních odkazů, kterou doplňují 4 přílohy otisků prestižních publikací vztahujících se k tématu dizertace. Formální členění dizertace odpovídá zavedeným zvyklostem. K výzkumu byly použity myši kmene C57BL/6J, které pocházely z konvenčního bezmikrobního (gnotobiotického) chovu, kterým byl aplikován subkutánně sítnicový antigen IRBP 1-20 (interphotoreceptor retinoid binding protein). Standardní sledovací doba experimentu byla 35 dnů. Reaktivita imunitního systému k vyvolání mírné zadní autoimunitní uveitidy byla potencována kompletním Freudovým adjuvans (CFA) a pertusovým toxinem (PT). V metodách výzkumu jsou v podkapitole 3.3. *Zásady úspěšné indukce uveitidy* podrobně popsány osobní zkušenosti s klíčovými body v protokolu indukce uveitidy, které jsou pro ni nezbytné a **svědčí pro velmi pečlivou a cílenou badatelskou činnost s cílem splnit vytyčený záměr.** *Osobní zkušenosti s klíčovými body v protokolu indukce uveitidy byly podkladem publikace uvedené v příloze č. 2.*

Hodnocení intenzity zánětu bylo prováděno dle standardizovaných protokolů jednak biomikroskopicky in vivo a jednak histologicky post mortem na řezech barvených hematoxilinem eosinem. Klinický systém hodnocení známek zánětu sledoval 4 parametry: infiltráty sítnice, infiltraci zřakového nervu, retinální cévy a strukturální změny sítnice a dle jejich intenzity je zařadil do stupnice 1 až 4. *Klinické projevy EAU včetně bohaté obrazové dokumentace byly podkladem samostatné publikace uvedené pod přílohou č.3.* Mikroskopické hodnocení histologických řezů barvených hematoxilinem eozinem bylo prováděno dle zavedeného systému hodnocení od stupně 0 (žádný zánět) do stupně 4 (silný zánět). Mezi histologické známky zadní uveitidy patří retinální záhyby, zánětlivá ložiska v sítnici (často lokalizovaná v blízkosti ciliárního tělesa), vaskulitida, vitritida, neovaskularizace sítnice či ztráta zevních segmentů fotoreceptorů. Zánětlivé změny probíhají také v retinálním pigmentovém epitelu sítnice, dochází k jeho hyperplazii a proliferaci mikroglie, která pigment fagocytuje. Vzorky tkání byly analyzovány také imunohistochemicky a průtokovou cytometrií. Myši s uveitidou byly léčeny perorálními antibiotiky (metronidazol a ciprofloxacin) podávanými profylakticky týden před indukcí a po celou dobu experimentu do

35. dne po indukci. Rovněž byl testován účinek léčby uveitidy mykofenolát mofetilem, cyklofosfamidem a golimumabem.

Data byla zpracována pomocí programu GraphPad Prism pro Windows. K porovnání mezi skupinami byly použity neparametrické testy Kruskalův-Wallisův a Mann-Whitneyův.

První část výsledků kvantifikuje zastoupení T lymfocytů a makrofágů v sítnici v různých fázích uveitidy. Dle autorčiných výsledků infiltrace sítnice T lymfocyty nastává 10. den po indukci, infiltrace makrofágy až od 20. dne po indukci. Celkový počet T lymfocytů proti makrofágům je v pozdní fázi více než dvojnásobný. Z histologických řezů je patrné, že v pozdní fázi makrofágy lemují zánětlivé ložisko tvořené T lymfocyty a podílí se tak na úklidové reakci. (*Hypotéza II: kvantifikovat zastoupení T lymfocytů a makrofágů v sítnici v různých fázích uveitidy*)

Ve druhé části výsledků byl zhodnocen vliv redukovaného mikrobiálního prostředí (bezmikrobní myši a myši léčené antibiotiky) na intenzitu zánětu u myšičího modelu EAU indukovaného pomocí IRPB 1-20 a potencionovaného CFA a PT. Intenzita nitroočního zánětu byla sledována ve 3 skupinách: A) bezmikrobní myši, B) myši profylakticky léčené perorálními ATB a C) myši léčené ATB ode dne indukce EAU. Intenzita zánětu byla porovnána s kontrolní skupinou EAU. Hodnocení bylo provedeno jednak klinicky in vivo a jednak histologicky odečteno 35. den po indukci. Byla prokázána nižší intenzita zánětu u myši v redukovaném mikrobiálním prostředí: u myši léčených profylakticky perorálními ATB a u bezmikrobních myši. V podkapitole Účinek imunomodulátorů na intenzitu zánětu byl potvrzen účinek mykofenolát mofetilu a cyklofosfamidu v léčbě experimentální autoimunitní uveitidy.

Na začátku dizertace měla studentka cíl své experimentální práce vyprofilován ve čtyřech hypotézách, které usměrnily její výzkum a dovedly ji ke konkrétním závěrům. Jak sama autorka několikrát uvedla, zabývala se pouze částí rozsáhlé problematiky IRBP-indukovaného nitroočního zánětu na myšičích modelu EAU. Průběh zánětu u myši kmene C57BL/6 je mírný a chronický, blíže připomíná autoimunitní uveitidu u lidí. Minimální či žádné postižení předního segmentu u tohoto modelu je výhodou, neboť umožňuje dobré podmínky pro vyšetření sítnice při biomikroskopii in vivo i při vysoké aktivitě zánětu. Představuje reprodukovatelný model otvírající další možnosti výzkumu v oblasti zadní uveitidy autoimunitní etiologie. Výhodou zvoleného modelu je relativně dlouhá doba aktivity zánětu trvající přibližně 3-4 týdny. Biomikroskopicky byla nejvyšší intenzita zánětu pozorována 25. den po indukci, naproti tomu histologicky byla největší kumulace zánětlivých změn 35. den po indukci.

Závěrem lze konstatovat, že zvolené téma dizertační práce je aktuální, neboť experimentální modely autoimunitní uveitidy umožňují detailnější studium imunopatogenetických mechanismů zánětu a jejich cílenou regulaci tohoto závažného onemocnění, které i přes současné terapeutické možnosti způsobuje těžké poruchy zraku u lidí zejména střední věkové kategorie. **Náročný cíl, který byl specifikován v úvodu dizertace, byl splněn:**

- byl zaveden reprodukovatelný a stabilní myší model EAU indukovaný u myší kmene C57BL/6J sítnicovým antigenem IREBP 1-20

- zjištěna kritická místa v protokolu indukce a stanoveny základní předpoklady pro úspěšnou indukci uveitidy

- pozorován vrchol zánětlivých změn 25. den po indukci při klinickém vyšetření a až 35. den při histologickém vyšetření, naopak atrofické pozánětlivé změny zaznamenány dříve při klinickém vyšetření

- byly imunohistochemicky detekovány CD3+ T lymfocyty a F4/80+ makrofágy v sítnici, v průběhu zánětu se jejich počet prudce zvyšuje 25. den od indukce, v dalším průběhu je vzestup pomalejší. Výrazné zvýšení počtu těchto zánětlivých buněk časově koreluje s vrcholem zánětu

- kvantitativní analýza T lymfocytů a makrofágů na sítnici u bezmikrobních myší prokázala signifikantně nižší počet T lymfocytů, což potvrzuje, že čím je v sítnici nižší počet T lymfocytů, tím je intenzita uveitidy nižší

- signifikantní výsledek snížení intenzity zánětu na IRBP-indukovaném modelu EAU podporuje použití MMF v léčbě zadní uveitidy autoimunitní etiologie v humánní medicíně.

K dizertantce mám 2 dotazy:

1) Biomikroskopicky byla nejvyšší intenzita zánětu pozorována 25. den po indukci, naproti tomu histologicky byla největší kumulace zánětlivých změn 35. den po indukci. Jak sama uvádíte, "Tyto diskrepance mohou být vysvětleny rozdílným rozsahem hodnocené sítnice", neboť při histologickém vyšetření bylo hodnoceno pouze 8-10 řezů, a díky tomu nemusí být zachyceny všechny léze.

- Byla histologicky vyšetřována vždy stejná oblast sítnice nebo se vyšetřované oblasti sítnice u každého oka lišily?

- Existuje dle vašeho názoru ještě jiné vysvětlení pro tuto diskrepanci ?

2) Budete pokračovat v tomto výzkumu a jakým směrem

Konstatuji, že se dr. Klímová zhostila náročného tématu své dizertace se ctí, práce odráží její velkou píli a houževnatost, se kterou prováděla experimentální práci. Je též zřejmé, že pracovala velmi systematicky, bez zbytečného zabíhání do nepotřebných detailů, kriticky hodnotila i úskalí, se kterými se při této práci setkala. Dizertace je psána velmi přehledně, závěry jsou formulovány konkrétně s odkazy na stanovený cíl. Na vysoké úrovni dizertace má bezpochyby vliv působení zkušeného a erudovaného školitele. **Dizertační práce MUDr. Anety Klímové s názvem "Mechanismy patogeneze experimentální autoimunitní uveitidy a možnosti jejich ovlivnění" prokázala předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu "Ph.D." za jménem.**

doc. MUDr. Šárka Pitrová, CSc., FEBO

