

Oponentský posudek doktorské dizertační práce Mgr. Jany Včelákové nazvané *"Predikční imunologické znaky u diabetes mellitus 1. typu"*

Autorka předložila dizertační práci založenou na 5 publikacích v impaktovaných časopisech, z nichž na jedné je první autorkou. Všechny tyto práce se týkají časných mechanismů vzniku diabetu mellitu 1. typu (DM1) a možností jeho predikce. Nález vhodných biomarkerů pro predikci DM1 ve stádiu pre-diabetu má potenciálně velký klinický význam a jde tedy o téma velice aktuální. Dále je vhodné zdůraznit, že Mgr. Včeláková je spoluautorkou dalších 4 publikací v impaktovaných časopisech a 1 publikace v časopise recenzovaném, které se taktéž týkají DM1, ale které nejsou podkladem předkládané dizertační práce.

Předkládaná práce je psaná česky a strukturovaná jako komentovaný soubor zmíněných publikací, který je dále opatřen společným úvodem a závěrem. Součástí práce je též standardně členěný autoreferát, který shrnuje základní myšlenky práce. Z metodického pohledu jsou data prezentovaná v dizertační práci založena zejména na metodě expresního mikročipu, průtokové cytometrii a metodě ELISPOT po restimulaci buněk *in vitro*. Jako zásadně důležité hodnotím i získání vzorků od zdravých příbuzných pacientů s DM1, což umožňuje analýzu predispozice k této chorobě a získání nových originálních dat o buněčné imunitě při DM1.

K práci mám několik připomínek a otázek:

- 1) V závěru autoreferátu kandidátka píše, že "dizertační práce shrnuje výsledky práce Laboratoře autoimunitních onemocnění Pediatrické kliniky za několik posledních let, na kterých jsem se aktivně podílela". Jaká byla role kandidátky na předložených publikacích a které metodiky sama prováděla?
- 2) Vzhledem k zaměření práce na časnou diagnostiku DM1, tak v úvodu trochu postrádám shrnutí současné diagnostiky DM1 a v závěru také více informací o potenciálním skrínigovém programu, který by z práce mohl vyjít. Jaká je senzitivita, specifická, pozitivní a negativní predikční hodnota biomarkerů, které jsou v současné době již známy (např. vyšetření HLA a/nebo kombinace anti-IA2, anti-GAD65 a anti-ZnT8 autoprotilátek), o kterých se kandidátka zmiňuje?
- 3) Tabulka 2 ("Epidemiologie DM1. typu") mi přijde jakoby vytržená z kontextu (případně nedostatečně popsaná), není mi jasné, jakou populaci popisuje. Přijde mi, že spíše než epidemiologii popisuje rizikové faktory.
- 4) V předložených publikacích je analyzován expresní profil buněk z periferní krve (PBMC). Jde o směs buněk se značnou variabilitou mezi jedinci, zejména v časném věku (Morbach H. et al. Clin Exp Immunol. 2010;162:271-9). Navíc pacienti s diabetem mohou mít jiné složení PBMC, zejména na úrovni B lymfocytů, což by mohlo vnést do výsledků systematickou chybu (Graber R. et al. Apoptosis. 1999;4:263-70.). Nelišilo se složení PBMC, zejména proporce B lymfocytů a eozinofilů, mezi testovanými skupinami? Existují data na složení PBMC u DRL DM1?
- 5) V příložených publikacích se občas vyčleňují "imunologické dráhy", jak je tato skupina definována?
- 6) Hlavním cílem druhé příložené publikace byla analýza patogeneze DM1. Ve výsledcích jsem ale našel pouze popis změněných genů. Bylo by možné na základě těchto dat

- navrhnout (či doplnit současný) model patogeneze diabetu a případně předpovědět faktor prostředí, který vede ke vzniku DM1 u predisponovaných jedinců?
- 7) Genová exprese některých genů nemusí korelovat s hladinou syntetizovaných proteinů. Jaký je vztah mezi expresí a syntézou u CD4, STAT3 a TGF- β ?
 - 8) Počty buněk produkujících IFN- γ a IL-17 po 72h kultivaci s IA2 a GAD65 vykazují neobvyklý obraz (Labikova J et al. 2013). Ve většině případů jsou průměrné hodnoty počtu spotů nestimulovaných buněk vyšší než u buněk stimulovaných a není patrný efekt ředění antigenů. Tento efekt se zdá být způsobený vysokou bazální produkcí cytokinů. Na antigen-specifickou odpověď by pak v nejlepším případě připadaly 3-4 buňky na 10^5 PBMC. Byly média, suplementy, plast a stimuly testovány na přítomnost mikrobiální kontaminace? Jaké množství buněk bylo stimulováno k produkci cytokinů pomocí pozitivní kontroly? Lišil se charakter jednotlivých spotů mezi nestimulovanými a stimulovanými buňkami?
 - 9) Zajímavá je i zvýšená celková frekvence buněk produkujících IFN- γ a IL-17 u skupiny IA2. Jaká byla viabilita buněk použitých na ELISPOT u jednotlivých skupin?
 - 10) Rozdíl mezi GPG třídy A (ODN2006) a B (ODN2216) na stimulaci PBMC je značný a patrně odráží jejich rozdílný vliv na pDC. Přítomnost jiných TLR ligandů může výrazně měnit tvorbu IFN I. typu (Dai J. et al. J Immunol. 2004;173:1535-48; Richez C. et al J Immunol. 2009;182:820-8). Byly oba stimuly testovány na mikrobiální kontaminaci?
 - 11) Výsledky o zvýšené reaktivitě PBMC na TLR9 agonistu u nediabetických jedinců v porovnání se zdravými jedinci a DM1 jsou zajímavé. Efekt některých probiotických bakterií v experimentálním modelu střevních zánětů je mediován jejich DNA (CPG) přes TLR9 (Rachmilewitz D et al. Gastroenterology, 2004; 126:520-8). Očekáváte protektivní efekt některých komenzálních mikrobů u nediabetických členů rodiny?
 - 12) Jaký byl důvod ke stimulaci TLR9, když hlavní změny byly v dráze TLR3-TRIF a TLR4?
 - 13) Kromě TLR7 a TLR8 je právě TLR3 jedním z významných sensorů pro enterovirus EV68-71. Byl nějaký rozdíl v reaktivitě PBMC čtyřčet na agonistu TLR3 Poly(I:C)?

K formální stránce práce bych měl jen několik drobných připomínek. Vlastní dizertace je poměrně dobře napsaná, proto je škoda, že autoreferát vykazuje známky velmi ukvapené přípravy. V textu se občas opakují stejné informace, např. definice DM1 se v obou dokumentech, což je redundantní. Text dále obsahuje několik nevhodných či neobvyklých slovních obrátů jako například "která rozhodně není 100%" místo vhodnějšímu údaji o procentu konkordance, "což má za následek ne ideální vývoj", "naivní a získaná imunita", "2x 10⁵ PBMC" místo 2 x 10⁵ PBMC, "BioBreeding (BB) krysa", místo potkan, atd.

Dále mám několik obecnějších připomínek k formátování textu, které sice nijak neodporuje zavedeným pravidlům a zvyklostem, ale odporuje současným poznatkům o ergonomii a typografickým doporučením. Členění textu "do bloku" na celou šíři stránky zbytečně prodlužuje dobu nutnou k jeho čtení (Trollip SR and Sales G, 1986, 28:159-163) a proto není vhodné k psaní vědeckých prací. Práce je tištěná pouze na jednu stranu stránky, což podle mě zbytečně zatěžuje rozpočet, přírodu a některé svalové skupiny při jejím přenášení.

Předložená dizertace přináší řadu původních výsledků, které byly publikovány v impaktovaných časopisech. Autorka dále prokázala, že je schopná vědeckého výstupu, který významnou měrou překračuje požadavky pro publikační aktivitu studentů postgraduálního doktorského programu. Výsledky, které během svého studia získala, jsou přínosem pro základní výzkum a slibují aplikační výstupy využitelné v klinické medicíně. **Proto doporučuji, aby se tato dizertační práce stala podkladem pro udělení vědecké hodnosti Ph.D., v programu Imunologie.**

V Praze dne 15. 2. 2016

MUDr. Milošlav Kverka, Ph.D.

Strana: 2/2