

Oponentský posudek dizertační práce

Uchazeč:	MUDr. Eva Krepsová
Pracoviště:	Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Dizertační práce:	Markery transplantační tolerance po transplantaci ledviny
Oponent:	Doc. MUDr. Karel Krejčí, Ph.D.
Pracoviště:	III. interní klinika – nefrologická, revmatologická a endokrinologická, FN a LF UP Olomouc

Text posudku

Ve své dizertační práci se MUDr. Eva Krepsová (roz. Kryštůfková) zaměřuje na problematiku možnosti individualizace imunosupresivních protokolů u pacientů po transplantaci ledviny v závislosti na imunologickém stavu příjemce orgánu, zejména na tzv. imunitoleranci. Imunitolerance hraje významnou roli v rozvoji či absenci odhojovací reakce (rejekce) organismu vůči transplantovanému orgánu a může být z části sledována pomocí exprese genů asociovaných s tolerancí a rovněž pomocí různých biomarkerů. Je známo, že ji lze ovlivnit různými indukčními imunosupresivními protokoly, které jsou v předkládané práci z tohoto pohledu autorkou porovnávány v podobě indukce provedené pomocí polyklonálního králičího anti-thymocytárního globulinu (rATG) či monoklonální protilátky proti receptoru pro interleukin-2.

Řešená problematika je vysoce aktuální, s předpokládaným dopadem výstupních dat na klinickou praxi. Vlastní práce je rozdělena do 7 částí – úvod, přehled problematiky, hypotézy a cíle, metody, výsledky, diskuze a závěry. V práci byly v rámci ověřování hypotéz stanoveny 4 cíle. Výsledky práce byly dosud publikovány formou 4 sdělení v časopise s impakt faktorem, kde je MUDr. Eva Krepsová ve 2 případech první autorkou a dvakrát spoluautorkou. Je také první autorkou jedné přehledné práce na dané téma publikované v českém recenzovaném časopise. Celkem má dizertační práce 93 stran textu, 5 tabulek a 13 obrázků.

V úvodu své práce MUDr. Eva Krepsová zmiňuje komplikace nedostatečné nebo naopak nadměrné imunosuprese po transplantaci ledviny v podobě různých forem rejekčního poškození štěpu resp. komplikací, potenciálně ohrožujících život příjemce ledviny. Zdůrazňuje tak nutnost optimalizace a individualizace imunosupresivní terapie a s tím souvisejícího hledání spolehlivých markerů, které by umožnili identifikovat předtransplantační individuální míru aloreaktivity a po transplantaci odhalili stav neodpovídavosti vůči štěpu (markery tolerance) nebo včas odhalili začátek imunitní reakce proti štěpu (markery rejekce). To by umožnilo individualizovat imunosupresivní terapii z hlediska její agresivity a minimalizovat výskyt rejekčních epizod na jedné a život ohrožujících komplikací z nadměrné imunosuprese na druhé straně.

V další části práce autorka shrnuje dosavadní možnosti hodnocení imunitního stavu potenciálního příjemce ledviny v předtransplantačním období po stránce zjištění úrovně protilátkové a buněčné alosemitizace a buněčné imunity. Zmiňuje standardní metody stanovení panel reaktivních protilátek, cross-matchové techniky, detekci a kvantifikaci paměťových aloreaktivních T lymfocytů pomocí IFN-gamma ELISPOTU a stanovení solubilního SD30. Dále je popsána celá řada krevních markerů sledovaných v potransplantačním období, které by měly umožnit identifikovat pacienty s počínající rejekcí a včas terapeuticky zasáhnout nebo naopak rozpoznat pacienty, u kterých může být imunosuprese minimalizována, případně vysazena. Tyto krevní markery (případně i močové) by mohli do budoucna nahradit invazivní metodu, kterou je biopsie transplantované ledviny.

Cíle dizertační práce MUDr. Evy Krepsové byly formulovány ve vztahu k vyhodnocení efektu různé indukční léčby na počet regulačních T lymfocytů v periferní krvi a v asociaci na tyto počty vyhodnotit krátkodobé výsledky transplantace. Dále byl sledován vliv rozdílné indukce na expresi genů asociovaných s tolerancí či rejekcí a na počet lymfocytárních populací asociovaných s těmito geny v periferní krvi po transplantaci. Cílem byla rovněž monitorace monocytárních subpopulací v periferní krvi v závislosti na různých imunosupresivních protokolech. Dalším cílem bylo ověřit, zda změny v míře exprese genů asociovaných s tolerancí budou v periferní krvi a ve štěpu příjemců léčených imunosupresí spojeny s absencí rejekce v transplantované ledvině.

Do studie bylo zařazeno 75 pacientů, kterým byla transplantována ledvina od zemřelého dárce. Pacienti byli léčeni standardním imunosupresivním protokolem zahrnujícím kalcineurinový inhibitor, mykofenolát mofetil a kortikosteroidy, variabilně byla aplikována i indukční imunosuprese dle imunologického rizika pacienta. Vzorky periferní krve byly brány v pravidelných intervalech dle protokolu studie. Ke sledovanému vzorku transplantovaných byl použit srovnávací soubor 20 zdravých dobrovolníků pro studii subpopulací monocytů v periferní krvi. Protokolární biopsie ledvinových štěpů byly prováděny 90. den po transplantaci a rovněž při podezření na akutní rejekci. Léčba akutních rejekcí byla vedena dle závažnosti a typu rejekce dle stanoveného protokolu. Pacienti, kteří byli léčeni rATG v rámci antirejekční terapie a nedostali žádnou indukci či indukci basiliximabem, nebyli dále statisticky hodnoceni. V souboru byly pomocí průtokové cytometrie analyzovány buněčné populace pomocí povrchových znaků, hodnoceny mononukleární buňky z periferní krve. Analýza genové exprese byla provedena izolací RNA z plně krve a ze vzorku tkáně transplantované ledviny odebrané při biopsii. Pro následnou syntézu komplementární DNA byla použita reverzní transkriptáza. Pomocí kvantitativní real-time RT-PCR metody byly stanoveny profily genové exprese 11 vybraných genů asociovaných s tolerancí či rejekcí.

Cílem 1 bylo vyhodnotit vliv indukční imunosuprese na regulační T lymfocyty v periferní krvi. Bylo prokázáno, že indukční terapie rATG byla spojena s expanzí T regulačních buněk CD4+CD25+FoxP3+ a s nižším výskytem rejekce v porovnání s pacienty bez indukce. Podobně u pacientů s indukci basiliximabem pokud u nich přetrvával vyšší poměr T regulačních CD4+FoxP3+/T efektorových lymfocytů, neměli tito rejekci v průběhu prvních 3 měsíců po transplantaci. Cílem 2 bylo vyhodnotit vliv indukční imunosuprese na expresi genů asociovaných s tolerancí a rejekcí a počty lymfocytárních subpopulací v periferní krvi. Aplikace rATG byla asociována s poklesem transkriptů všech sledovaných T buněk a NK buněk ale i s up-regulací některých transkriptů asociovaných s rejekcí, MAN1A1 a TLR5. Léčba basiliximabem pak byla spojena se vzestupem absolutního počtu T regulačních buněk CD4+FoxP3+ a vyšší hladinou exprese genů asociovaných s tolerancí, FOXP3 a TCAIM. Cílem 3 bylo monitorovat změny v periferních subpopulacích monocytů a to prozánětlivých CD14+CD16 a

imunosupresivních CD14+CD163 v časně fázi po transplantaci ledviny v návaznosti na různé aplikované imunosupresivní režimy. Aplikace rATG (byť opožděně) vedla k expanzi subpopulace CD14+CD163, zatímco basiliximab fenotyp monocytů neovlivnil. Cílem 4 bylo sledovat v periferní krvi expresi osmi vybraných genů a současně vyhodnotit expresi těchto genů v renální tkáni získané biopsií štěpů. Různé expresní profily byly porovnány mezi skupinami pacientů s rozdílným histologickým nálezem. U pacientů bez rejekce případně s hraničními rejekčními změnami byly pozorovány signifikantně vyšší počty B lymfocytů v periferní krvi, signifikantně vyšší byla exprese genů MS4A1 (CD20), TCL1A, CD79B, TCAIM a FOXP3. Tyto rozdíly byly nejvyšší v průběhu prvních 3 měsíců po transplantaci. Ve skupině s rejekcí byl naopak up-regulován TMEM176B. V histologických vzorcích štěpů byla u pacientů s tolerancí bez rejekce pozorována vyšší exprese TCAIM.

Výsledky práce MUDr. Evy Krepsové přispívají k aktuální a intenzivně sledované problematice potransplantační tolerance a rejekce za podmínek stále limitovaného dlouhodobého přežívání ledvinných štěpů ze zemřelých dárců. Ve své práci se autorka pokusila zhodnotit vliv různých indukčních imunosupresivních protokolů na počty regulačních T lymfocytů a expresi molekulárních markerů asociovaných s rejekcí či tolerancí. Práce tak navazuje na úsilí při hledání neinvazivních možností detekce rejekce či tolerance a její výsledky jsou v některých aspektech prioritní.

Dotazy oponenta k obhajobě dizertační práce

1. Sledujete na vašem pracovišti i nějaké markery transplantační tolerance dostupné z vyšetření vzorku moči, a pokud ano, máte k dispozici data korelující močové, krevní a histologické nálezy?

Závěr

Dizertační práce MUDr. Evy Krepsové je výsledkem dlouhodobé systematické klinické a výzkumné práce autorky a jejího školitele na poli transplantací ledvin a výzkumu potransplantační rejekce a tolerance a hodnotím ji jako velice kvalitní. Po stránce formální je dizertační práce psána čtivou formou, je velmi dobře zpracována a prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci. Studentka splňuje aktuálně platná publikační kritéria pro konání státní doktorské zkoušky na Univerzitě Karlově v Praze, 1. lékařské fakultě. Doporučuji proto přijmout dizertační práci v předložené formě k obhajobě a na jejím základě doporučuji udělit MUDr. Evě Krepsové vědecký titul Ph.D.

V Olomouci dne 17.3. 2016.

doc. MUDr. Karel Krejčí, Ph.D.
III. interní klinika-NRE
FN a LF UP Olomouc
I.P. Pavlova 6, 779 00, Olomouc