



RNDr. Daniel Smrž, Ph.D.

Ústav imunologie

Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta
a Fakultní nemocnice Motol



V Úvalu 83

150 06 Praha 5

Email: daniel.smrz@lfmotol.cuni.cz

Tel. 244-43-5968

Posudek oponenta diplomové práce **Bc. Zuzany Kroulíkové**

„Tolerogenní dendritické buňky jako nová buněčná terapie v diabetu I. typu“

Diplomová práce Bc. Zuzany Kroulíkové byla vypracována pod vedením MUDr. Davida Fundy, Ph.D. (školitel), který se zabývá studiem diabetu I. typu (T1D) s využitím myších zvířecích modelů. V posledních letech se výzkum Dr. Fundy zaměřuje na možnosti využití buněčné (imuno)terapie v léčbě a prevenci tohoto onemocnění, a to zejména s využitím *in vitro* připravených tolerogenních dendritických buněk (tolDC).

Ve své diplomové práci se Bc. Kroulíková zabývala empirickým testováním imunoterapie T1D pomocí *in vitro* připravených myších tolDC na myším zvířecím modelu NOD (z angl. non-obese diabetic) a SCID (z angl. severe combined immunodeficiency) s cílem zjistit, jak příprava tolDC a způsob jejich podání experimentálním myším ovlivní spontánní rozvoj T1D u NOD myší či zabrání indukovanému rozvoji T1D u SCID myší. V první části práce se studentka zabývala *in vitro* přípravou a testováním tolDC. Ve druhé části práce studentka aplikovala *in vitro* připravené tolDC experimentálním myším a sledovala jejich migraci a distribuci *in vivo* v závislosti na způsobu jejich aplikace. Ve třetí části pak studentka hodnotila terapeutickou účinnost tolDC v závislosti na způsobu jejich aplikace experimentálním myším.

V první části své práce se studentka zabývala přípravou myších tolDC. TolDC byly připravovány diferenciací buněk kostní dřeně pomocí GM-CSF a IL-4. Pro indukci tolerogenního fenotypu byl použit vitamin D2 v kombinaci s dexamethazonem, a to podle tří různých protokolů, které se lišily kombinací a délkou přítomnosti obou „tolerogenzujících“ činidel během diferenciaci na DC. Jako negativní kontrola byly DC připraveny bez použití vitaminu D2 a dexamethazonu. Tolerogenní fenotyp připravených DC byl evaluován skrze povrchovou expresi vybraných

maturačních markerů po stimulaci DC silným maturačním činidlem, MPLA (syntetický analog LPS). Připravené DC byly zároveň testovány na povrchovou expresi chemokinového receptoru CCR7. Z analýz vyplynulo, že DC připravené podle protokolu kombinujícího vitamin D2 s dexamethazonem a aplikujícího tato činidla od samého začátku buněčné kultivace mají pravděpodobně nejvyšší tolerogenní a migrační potenciál. Na základě těchto výsledků byly DC připravené podle tohoto protokolu testovány v následujících *in vivo* studiích.

V druhé části studentka sledovala migraci a distribuci připravených tolDC *in vivo* v závislosti na způsobu jejich podání experimentálním myším. Těmito způsoby podání byla intraperitoneální, intravenózní a subkutánní aplikace tolDC. Výsledky poměrně rozsáhlých experimentů prokázaly, že způsob podání tolDC významně ovlivňuje jejich konečnou distribuci v tkáních a orgánech experimentálních myší. Tyto výsledky naznačovaly, že tato distribuce může mít rovněž i vliv na účinnost terapie T1D. Velmi zajímavým výsledkem bylo i odhalení, že subkutánní aplikace tolDC vedla k vytvoření lokalizovaných makroskopických depozitů v místě subkutánní aplikace. Při podrobnější analýze se ukázalo, že tyto makroskopické depozity obsahují aplikované DC, které byly v těchto depozitech „uvízlé“ a zde postupně odumíraly. Tato zjištění jsou velmi zajímavá, jelikož poukazují na skutečnost, že způsob aplikace může významně ovlivnit nejenom distribuci terapeutických buněk *in vivo*, ale i jejich samotné chování.

Závěrečná část práce je věnována hodnocení terapeutické účinnosti připravených tolDC v myším modelu NOD-SCID, u kterého byla sledována schopnost tolDC zabránit indukovanému rozvoji T1D po transferu splenocytů z NOD myší do SCID myší. Výsledky prokázaly, že indukovanému rozvoji T1D u SCID myší je možné zabránit pomocí tolDC přibližně u jedné třetiny myší. Lepších, ne však zatím statisticky signifikantních, výsledků bylo dosaženo při intravenózní a intraperitoneální aplikaci tolDC než tomu bylo při aplikaci subkutánní.

Diplomová práce Bc. Kroulíkové je zpracována logicky, přehledně, a její struktura a rozsah splňují současné standardy diplomové práce. Velkým přínosem práce je, že je psaná v anglickém jazyce ve velmi čtivé podobě. Úvod práce je přehledný a čtenáře srozumitelným způsobem seznámí s tématem T1D a buněčné imunoterapie. Metodická a experimentální část jsou také srozumitelně a z velké části dostatečně detailně vypracovány. Popis experimentů je snadno pochopitelný. K realizaci experimentů bylo rovněž nutné velmi dobře fungující laboratorní zázemí zvěřince. Výsledky jsou členěny dle jednotlivých cílů práce a v diskuzi adekvátně hodnoceny a zasazeny do kontextu současného poznání.

K práci a k autorovi práce mám následující drobné připomínky a dotazy:

- 1/ V abstraktu jsou některé informace příliš detailní. Bylo by proto vhodnější abstrakt strukturovat na úvod, metody, výsledky a závěry.
- 2/ V úvodu v kap. 1.1 na straně 3 u poslední věty by bylo dobré uvést citaci.

- 3/ V úvodu v kap. 1.1.1 na straně 3 ve třetím odstavci je v závorce uvedeno, že pro klinické účely se používají mononukleární buňky periferní krve z několika mililitrů periferní krve. Patrně se jedná o překlep, jelikož se obvykle používá řádově mnohem více periferní krve, spíše však ale leukaferetický produkt.
- 4/ V úvodu v kap. 1.1.1 na straně 4 v prvním odstavci nejsou jasné poslední dvě věty, které se týkají „antisense oligonucleotides-treated autologous dendritic cells“ a „B220⁺ CD11c⁻ B cells“. Je možné více vysvětlit?
- 5/ V úvodu v kap. 1.1.3 na straně 12 je v prvním odstavci uvedeno „Older but very elegant study by...“. Tento přívlastek není dále nějak rozveden. Jak je možné si ho vysvětlit? Je obecně lepší se do budoucna v odborném textu snažit zdržet podobných subjektivních hodnocení.
- 6/ V úvodu v kap. 1.2 ve druhém odstavci by mohlo být krátce uvedeno, o jaké klastrované podskupiny T1D se jedná.
- 7/ V úvodu v kap. 1.2.3 na straně 18 v prvním odstavci na konci by bylo dobré uvést citaci.
- 8/ V metodách v kap. 1.2.5 na straně 20 v pátém řádku prvního odstavce jsou uvedeny jako materiál kultivační Petriho misky. Technická otázka: Byly destičky plastové nebo skleněné?
- 9/ V tomtéž odstavci uvedeném v bodu 8 je popsáno, že v den 6 byla polovina média nahrazena čerstvým, buňky byly „sebrány, spočítány a resuspendovány v 10 ml čerstvého média“. Je možné tento postup více ozřejmit? Dále, byla během celého procesu používána pouze jedna a ta samá Petriho miska jako na začátku kultivace?
- 10/ V metodách a výsledcích: Proč se v experimentech používaly samice myši?
- 11/ Ve výsledcích v kapitole 1.3.1 na straně 24: Jak bylo morfologicky hodnoceno, že se jedná o DC či nedendritickou buňku?
- 12/ Ve výsledcích v kap. 1.3.2 na straně 26 jsou uvedeny reprezentativní výsledky. Z kolika myši tyto výsledky jsou?
- 13/ Tamtéž (viz. bod 12): Jaký z testovaných maturačních markerů DC si myslíte, že nejlépe odráží míru maturace či refrakterní charakter DC k maturaci? CD40?
- 15/ Ve výsledcích v kap. 1.3.3 na straně 27 v obrázku 8 je v legendě uvedeno, že tolDC v kultuře proliferovaly. Je možné toto chápat tak, že tolDC v kultuře proliferují nebo že se spíše jedná o kombinaci počáteční proliferace prekurzorů DC s jejich následnou diferenciací na neproliferující diferencované DC?
- 16/ Ve výsledcích: U barevných dotplotů cytometrických analýz nejsou ve vytištěné verzi často čitelné popisky os a některé legendy.
- 17/ Ve výsledcích: Numerické výstupy z dotplotů mohly být pro přehlednost sumarizovány v grafech.
- 18/ Ve výsledcích v kap. 1.5 na straně 38 v obrázku 14: Z kolika myši byly experimenty provedeny?
- 19/ Tamtéž (viz. bod 18): Plánují se *in vivo* experimenty, u kterých by se jako kontrola použily netolerogenní (maturované) DC a u kterých by se mohlo přepokládat, že nástup T1D u NOD-SCID modelu spíše uspíší?

20/ Plánují se do budoucna genetické studie, např. ektopická overexprese CCR7 u tolDC, které by zvýšily např. migraci či distribuci *in vivo*? Z technického hlediska, jak úspěšné/složité je geneticky manipulovat s připravenými DC z kostní dřeně myši (z vlastní zkušenosti či literatury)?

Děkuji za odpovědi.

Závěrem bych rád uvedl, že diplomová práce **je velmi zdařilá a vědecky přínosná**. Diplomová práce **splňuje odborná kritéria a požadavky**, které jsou kladené na diplomovou práci, a proto **doporučuji její přijetí k obhajobě**.

V Praze, dne 29. 8. 2019

RNDr. Daniel Smrž, Ph.D.