



V Praze dne 9.9. 2020

Školitelský posudek na diplomovou práci Bc. Anety Wróblové na téma: “Studium regeneračního potenciálu progenitorů Sertoliho buněk u pulců *Xenopus tropicalis* po amputaci ocasu”

Aneta Wróblová vypracovala svou diplomovou práci v laboratoři Vývojové biologie na katedře Buněčné biologie. Cílem práce bylo studium migračního a regeneračního potenciálu progenitorových buněk Sertoliho a myoidní peritubulární řady (XtiSC), které byly v naší laboratoři derivovány z varlat juvenilních samců žáby Drápatky tropické (*Xenopus tropicalis*). XtiSC vykazují celou řadu zajímavých vlastností pro potenciální využití v regenerativní medicíně v případě jejich odvození z lidských tkání. Expresním profilem se silně podobají mesenchymálním kmenovým buňkám, v xenogenním modelu (po intravenózní injekci do dospělé myši) mají imunomodulační schopnosti směrem k protizánětlivé reakci a v neposlední řadě diferencují do osteocytů, chondrocytů, adipocytů a kardiomyocytů po ošetření inhibítorem Wnt signální dráhy (CHIR99021).

Modelem pro regeneraci v rámci diplomové práce byl ocas pulců *X. tropicalis*, resp. obnova svalové tkáně po jeho amputaci. Drápatka tropická patří na rozdíl od příbuzné Drápatky vodní (*Xenopus laevis*) mezi diploidní organismy, a je tak více vhodná pro genetické a funkčně genové studie. Na druhou stranu není zavedeným modelem pro regeneraci jako *X. laevis*. Zajímavým fenoménem u Drápatky vodní je tzv. refraktorní fáze po amputaci ocasu, která postihuje pulce ve stádiu 45-47. Pokud je ocas amputován v tomto vývojovém období nedojde k jeho kompletní regeneraci. U Drápatky tropické nebyl tento fenomén studován a bylo nutné zjistit, zda i u tohoto modelového organismu existuje refraktorní fáze, či nikoliv. Aneta sledovala regenerační proces po amputaci ocasu u pulců od stádia 38 do stádia 50. Výsledkem bylo zjištění, že *X. tropicalis* refraktorní fázi postrádá a je tak vhodnějším regeneračním modelem než dosud používaná Drápatka vodní.

Jak jsem uvedl výše, hlavním cílem diplomové práce bylo studium regeneračního potenciálu progenitorových buněk XtiSC po jejich mikroinjekci do dorzální cévy pulce *X. tropicalis* s následnou amputací cca 1/3 ocasu. Na tomto místě bych rád vyzdvihl velkou trpělivost a manuální zručnost Anety s jakou byla schopná v krátkém čase úspěšně mikroinjikovat buňky do oběhového systému pulce s průměrem hlavních cév kolem 30 μm , a to pod stereomikroskopem. Výsledkem těchto experimentů bylo zjištění, že XtiSC bez problému přežívají po alogenní mikroinjekci a že cíleně migrují do místa amputace. Tento fakt potvrdil schopnost XtiSC reagovat



na signální molekuly produkované z poraněné tkáně. Otázkou tedy bylo jaké signály by to mohly být a zda XtiSC ovlivňují regenerační proces v amputované oblasti.

Jako primární signální molekula byl zvolen oxid dusnatý (NO) a Aneta studovala jak jeho vliv na atrakci XtiSC do místa poranění, tak jeho produkci XtiSC včetně exprese příslušných syntáz oxidu dusnatého (iNOS, nNOS a eNOS). Imunocytochemické a imunohistochemické barvení potvrdilo přítomnost iNOS a nNOS v XtiSC a na vibratomových řezech z okolí amputované tkáně. Dále pak Aneta potvrdila produkci oxidu dusnatého XtiSC po jejich transplantaci do pulců s následnou amputací ocasu. Prokázala tak, že XtiSC mohou sami fungovat jako atraktanty pro další buněčné typy, které se potenciálně podílejí na regeneračním procesu. Schopnost XtiSC být naopak přitahovány NO produkovaným poraněnou tkání Aneta studovala ve spolupráci s laboratoří Dr. Šindelky z Biocevu na xenogenním modelu pulců Drápatky vodní. Do jednobuněčných embryí mikroinjikovala morpholino oligonukleotidy namířené proti neurální a endoteliální syntáze oxidu dusnatého. Do takto modifikovaných pulců poté mikroinjikovala XtiSC a provedla amputaci 1/3 ocasu. Ve srovnání s kontrolními pulci došlo k významně nižší schopnosti progenitorových buněk migrovat do místa poranění. Aneta ve své diplomové práci využívala i pokročilé mikroskopické techniky jako light sheet mikroskopii pro studium produkce oxidu dusnatého v pulcích jak na modelu *X. tropicalis* tak *X. laevis*.

Posledním cílem diplomové práce bylo zjistit, zda mikroinjikované XtiSC mají vliv na počty satelitních buněk, které podobně jako u savců hrají důležitou roli při regeneraci svalové tkáně po poranění. Aneta potvrdila, že třetí den po poranění dochází na rozdíl od kontroly k významnému zvýšení satelitních (Pax7 pozitivních) buněk což je velice zajímavý výsledek z pohledu jejich možného využití např. při regeneraci poškozeného svalu po úraze či v rámci svalové dystrofie u lidí.

Aneta přistupovala k práci vždy se zájmem a pracovala velmi svědomitě a cílevědomě. To se odráží jak na enormním množství výsledků, kterých dosáhla, tak také na vysoké kvalitě zpracované diplomové práce. Značnou část obrázků připravovala zcela sama a z literární rešerše je jasně vidět, že studované problematice velmi dobře porozuměla a byla schopná sepsat kvalitní práci, která bude sloužit jako cenný podklad pro další studie na této problematice. Velmi rád hodnotím tuto práci jako výbornou.

Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.