

## Oponentský posudek na diplomovou práci

**Jméno posuzovatele:** Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.

**Autor:** Bc. Kateřina Palacká

**Název práce:** Imunomodulační a regenerativní potenciál mezenchymálních kmenových buněk v léčbě degenerativního poškození sítnice u myši

**Cíle práce:** Cílem práce je studium terapeutického potenciálu mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v experimentálním modelu degenerace sítnice v *in vivo* a *in vitro* systému.

### **Struktura (členění práce):**

Členění práce je standardní, práce obsahuje všechny požadované části. Rozsah práce: 50 stran vlastního textu.

### **Literární přehled:**

Literární přehled odpovídá tématu práce a je rozdělen do pěti hlavních podkapitol: 4.1. Degenerativní onemocnění sítnice, 4.2. Experimentální model farmakologicky navozeného poškození sítnice, 4.3. Kmenové buňky, 4.4. Využití MSC pro léčbu degenerativních onemocnění sítnice, 4.5. Příklady klinických studií.

Podle mého názoru části, které se zabývají imunomodulačními molekulami, které produkují MSC (TGF- $\beta$ , HGF, FGF, Cox-2, PGE2), by mohly být podrobnější. Např. faktor derivovaný z gliových buněk (GDNF) není v literárním přehledu dokonce vůbec popsán, ale v práci se stanovovala jeho genová exprese.

Taktéž by bylo vhodné detailněji popsat imunitní procesy, zapojení jednotlivých populací buněk imunitního systému v degenerativních onemocněních sítnice.

Hierarchické uspořádání jednotlivých podkapitol podle mého názoru není úplně přehledné.

Text v posledním odstavci v podkapitole 4.2. Experimentální model farmakologicky navozeného poškození sítnice obsahově patří do podkapitoly 4.2.1. Působení NaIO<sub>3</sub> na buňky sítnice *in vivo*. Text podkapitoly 4.2.2. NaIO<sub>3</sub> model pro studium degenerativních onemocnění sítnice není nutné samostatně vyčleňovat. Všeobecná podkapitola 4.3. Kmenové buňky, není podle mého názoru nutná, je spíše obecná a taktéž si myslím, že není nutné samostatně vyčleňovat podkapitoly 4.3.1.1. Diferenční schopnosti MSC a 4.3.1.2 Migrační schopnosti MSC (každá obsahuje jenom 4 věty).

Poslední odstavec podkapitoly 4.4.5. Využití MSC pro léčbu sítnice na modelu NaIO<sub>3</sub> popisuje podobné informace, jaké jsou již v podkapitole 4.2.3. Působení NaIO<sub>3</sub> na buňky sítnice *in vitro*. Hlavní podkapitola 4.5. Příklady klinických studií obsahuje jenom 4 věty a bylo by vhodnější její jiné hierarchické začlenění, nebo rozsáhlejší zpracování.

Autorka v práci použila dostatečný počet literárních zdrojů (82 citací). 49 literárních zdrojů je od roku 2015. V práci je citováno 18 review, pro lepší přehlednost by bylo vhodné je v Seznamu literatury označit. Chtěla bych obzvlášť pochválit zahrnutí funkčních odkazů jednotlivých citací přímo na dané literární zdroje.

Připomínky k citování literárních zdrojů:

- 1) V některých případech autorka cituje souhrnné články i tam, kde je dohledatelná primární literatura, která je citovaná přímo v daném review (např. na str. 14 Wooff *et al.*, 2019; Wilkinson-Berka *et al.*, 2019).
- 2) Citace Berkowitz *et al.*, 2015 na str. 14 patří na konec odstavce.
- 3) Forma zápisu citací na začátku věty (např.: *Balmer et al. (2015) pomocí metody detekce ...* na str. 15) není správná, je nutné uvádět citaci na konci věty.
- 4) Pro přehlednost je lepší uvádět citaci hned za danou informaci a ne spolu s jinými citacemi, kde je následně těžší zjistit, která informace pochází z kterého literárního zdroje (str. 19 Gao *et al.*, 2016; Luz-Crawford *et al.*, 2013, Zhou *et al.*, 2013).
- 5) V některých případech citace chybí. Např.: „*K prokázání, že buňky neuroretiny reagují na prostředí zánětu, jsme kultivovali explantáty sítnic v přítomnosti vybraných kombinací prozánětlivých cytokinů, které byly během patologických stavů detekovány ve sklivci pacientů.*“ (str. 41); „*Pro terapeutické účely se ukazuje vhodné použití především MSC, které byly detekovány v celé řadě tkání dospělého organismu, a u kterých kromě schopnosti diferenciacce a migrace do místa poškození bylo prokázáno imunomodulační a neuroprotektivní působení.*“ (str. 53); „*V poškozené sítnici dochází například k tvorbě inflamazómu, apoptóze buněk a také zvýšené angiogenezi.*“ (str. 54).
- 6) Seznam použité literatury je nejednotný, v některých případech neobsahuje čísla stran, u jiných jsou uvedena.

### **Materiál a metody:**

Autorka se během experimentální práce ozeznámila s řadou metod. Práce obsahuje jak pokusy *in vivo*, tak *in vitro*, a zároveň různé způsoby kultivace za různých podmínek, proto by pro snadnější orientaci bylo vhodné uvést celkové schéma pokusů.

Uvádím několik připomínek:

- 1) V podkapitole 5.1 Zvířata chybí popsání podmínek chovu myši (teplota, relativní vlhkost, krmná směs).
- 2) Na str. 29 uvádíte: „*Následně byly buňky separovány metodou MACS.*“ Chybí informace, jestli byl pro magnetickou separaci použit přístroj autoMACS Pro Separator, nebo se jednalo o ruční použití kolonek a magnetu. Taktéž formulace na str. 32 není vhodná: „*cDNA byla analyzována pomocí metody RT-PCR.*“ A z popisu metody (str. 32) není jasné, co se myslí konstatováním „*K testovaným vzorkům bylo přidáno 50 µl PCR vody.*“
- 3) V metodě ELISA chybí koncentrace protilátek, taktéž není uvedena koncentrace kolagenázy I při přípravě buněk pro průtokovou cytometrii.
- 4) Předpokládám, že na obr. 5 je znázorněná negativní kontrola (neznačené buňky) a ne FMO kontrola.
- 5) Chybí popis metody k výsledkům v podkapitole 6.2. Není jasné, o jakou stimulaci se jedná, v kombinaci s jakými cytokiny byly explantáty sítnic kultivovány. Je to popsáno jenom v legendě k obr. 10.

### **Experimentální část:**

Výsledky v experimentální části jsou přehledně popsány. Jak již bylo zmíněno, autorka se obeznámila s řadou metod, a tomu odpovídá i experimentální část.

Mám připomínku k používání tvrzení jako: „zvýšená/snížená“, když daná změna není signifikantní. Uvádím příklady:

Str. 42: „*Třetí den po podání NaIO<sub>3</sub> jsme zaznamenali v oblasti zadního segmentu oka zvýšený počet buněk pozitivních pro F4/80 ...*“. Str. 46: „*Podobných výsledků jsme dosáhli také pomocí metody RT-PCR, kdy byla měřena v neuroretině exprese genu pro rodopsin (Obrázek 15D)*“. „*Podání MSC dále snižovalo počet makrofágů infiltrovaných v neuroretině (Obrázek 14B)*“. Str. 49: „*Kultivace zadních segmentů s NaIO<sub>3</sub> způsobila u zvýšení genové exprese pro IL-1α a IL-6 (Obrázek 18A, B). Zároveň také došlo ke zvýšení exprese genů pro proapoptické molekuly Bax a p53 (Obrázek 18C, E) a snížení exprese antiapoptického Bcl-2 (Obrázek 18D)*“. Str. 52: „*TGF-β způsobilo snížení exprese genu pro IL-6 (Obrázek 19B), a mírné snížení exprese genu pro Bax (Obrázek 19C), u ostatních měřených molekul jsme však podobný významný efekt nezaznamenali (Obrázek 19A, D, E)*“.

### **Diskuse:**

Celkově diskusi chybí rozsáhlejší porovnání s jinými studiemi, které byly v této oblasti provedeny. Diskuse má jenom 4 strany a obsahuje informace pouze z 5 literárních zdrojů, které nebyly dosud citovány. V diskusi jsou taktéž některá podobná sdělení, která jsou už v literárním přehledu.

Níže uvádím příklad, který není dále diskutován.

Na str. 56 je uvedeno: „*Druhým cytokinem, jehož působení na poškozené sítnicové buňky jsme měřili, byl HGF. Ohtaka et al. (2016) ukázali protektivní efekt lokálně podaného HGF na degeneraci RPE vrstvy a fotoreceptorů. V modelu kultivaci zadních segmentů s NaIO<sub>3</sub> v přítomnosti HGF se nám však nepodařilo prokázat snížení exprese proapoptických genů v buňkách sítnice. Exprese genů pro IL-1α a IL-6 byla dokonce v tomto případě vyšší než v buňkách, které byly kultivovány pouze s NaIO<sub>3</sub>.*“

### **Závěry (Souhrn):**

Závěry jsou přehledné, korespondují se zadanými cíli práce.

### **Formální úroveň práce** (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální úroveň práce je celkově dobrá. Text obsahuje několik překlepů, nebo nevhodně stylizovaných a formulovaných vět. Autorka místy pracuje s jazykem neobratně, což ztěžuje čtivost a srozumitelnost textu.

Níže uvádím několik příkladů:

Abstrakt: „*Degenerativní onemocnění představují sítnice hlavní příčinu ztráty zraku u dospělých pacientů.*“

Str. 28: „K odstranění neadherentních buněk byly buňky kostní dřeně po 48 h kultivace opláchnuty médiem DMEM nahřátým na 37 °C.“

Str. 29: „Myši byly uspány intramuskulárně pomocí injekční stříkačky Omniplix U-100 insulin (B. Braun Melsungen AG, DE) 340 µl směsi Calypsolu a Rometaru v poměru 1:1.“

Str. 49: „Kultivace zadních segmentů s NaIO<sub>3</sub> způsobila u zvýšení genové exprese pro IL-1α a IL-6 (Obrázek 18A, B).“

Str. 54: „Při podání MSC 48 h před indukci degenerace sítnice pomocí NaIO<sub>3</sub> jsme použitím průtokové cytometrie naměřili v léčeném oku vyšší zastoupení buněk pozitivních pro znak fotoreceptorů a zároveň (pomocí metody RT-PCR) vyšší hladinu exprese genu pro rodopsin, oproti oku, které nebylo předem ošetřené.“

Další formální připomínky:

- 1) Seznam použitých zkratk je označen jako 1. kapitola, a tím pádem je kapitola Úvod 2. v pořadí. Správně by se mělo začít číslovat až od kapitoly Úvod. Kapitola Cíl práce by měla následovat až za kapitolou Literární přehled.
- 2) Zkratka pro real-time PCR je nesprávně zavedena, správně by mělo být RT-qPCR a ne PCR nebo RT-PCR.
- 3) Kapitola Cíl práce působí víc dojmem souhrnu než samotného vytyčení cílů práce.
- 4) Z formálního hlediska by bylo přehlednější, kdyby se typ písma legendy k obrázkům lišil od hlavního textu práce (např. obr. 2). U obr. 5 chybí označení „B“ při dot plotu. Popis obr. 8 a 14 není na stejné straně jako samotný obrázek. Obr. 9 je zbytečně velký.
- 5) U dot plotů z průtokové cytometrie je nutné uvádět znak buněk a ne fluorochrom.
- 6) U obr. 11 a 12 by pro přehlednost bylo vhodné vizuálně oddělit i v samotném obrázku (nejenom v popisu legendy) horní a dolní řadu grafů/dot plotů – zvýraznit, co patří k zadnímu segmentu oka a co k neuroretině (resp. zdravé nebo poškozené neuroretině).
- 7) Ve většině případů geny nejsou psány kurzívou.

**Otázky:**

- 1) Na str. 18 uvádíte: „Po stimulaci interferonem-γ (IFN-γ, interferon-γ) in vitro dochází u MSC k aktivaci indoleamin 2,3-dioxygenázy (IDO, indoleamin 2,3-dioxygenase), která katalyzuje metabolismus tryptofanu směrem ke kynuerinu. Expozice IFN-γ vede dále ke zvýšení produkce IL-6, který může mít protizánětlivé účinky, k expresi PD-L1 (programmed death ligand-1), cévní adhezivní molekuly (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1) galektinu-1 a mnoha dalších molekul (Gao et al., 2016; Huaman et al., 2019).“ Můžete rozvést, jakým způsobem se projevují protizánětlivé účinky IL-6?
- 2) Na základě čeho a jak byl vybrán referenční gen *GAPDH* u metody RT-qPCR?
- 3) Jaká byla životnost buněk pro průtokovou cytometrii? Jako výsledek z průtokové cytometrie uvádíte procentuální zastoupení jednotlivých buněk, jejich pokles nebo nárůst. Můžete dané výsledky vyjádřit pomocí absolutních čísel?

- 4) Co je známo z jiných studií (např. použitím metody single-cell sekvenování), jak heterogenní je populace mononukleárních fagocytů, která migruje do místa poškození sítnice? Jaká je heterogenita mikroglíí v sítnici? Pokud jsou známy různé subpopulace, čím se navzájem liší?
- 5) Ve Vašich experimentech jste podávali MSC před poškozením oka, zkoušeli jste je také podávat až po poškození? Pokud ano, s jakými výsledky?

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Jedná se o velmi dobrou diplomovou práci, ale s určitými nedostatky. Práci doporučuji k obhajobě a navrhuji celkové hodnocení velmi dobře.

Datum: 11.9.2020

Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.