

POSUDOK DIZERTAČNEJ PRÁCE

Dizertačná práca Mgr. Kristýny Kekulovej s názvom „Prírodné biomateriály a mesenchymálne kmenové bunky v liečbe míšneho poranenia“ bola vypracovaná pod vedením školiteľky PharmDr. Šárky Kubinovej, Ph.D. na 2.LF UK a na Ústave experimentálnej medicíny AVČR v štúdijskom programe Neurovedy.

Dizertačná práca rieši aktuálnu a dôležitú problematiku závažných poranení miechy, ktoré podľa Svetovej zdravotníckej organizácie postihujú 250-500 tisíc pacientov ročne a vedú často k strate senzorických a motorických funkcií u pacientov a k ich invalidite. Vývoj adekvátnej liečby poranení miechy je preto mimoriadne dôležitý.

V dizertačnej práci autorka zvolila k riešeniu problematiky komplexný prístup, ktorý zahŕňa nasledujúce body:

- 1) *Prípravu biomateriálov* na báze hydrogélu z medzibunkovej hmoty, konkrétne prasačí močový mechúr a prasačiu miechu, syntézu hydrogélu z hydroxyfenyl derivátu hyaluronanu (HA-PH-RGD), modifikovaného fibrinogenom a prípravu fibrinového gelu modifikovaného oligopeptidom AEIDGIEL.
- 2) *In vitro* hodnotenie cytotoxicity hydrogélů s hWJ-MSC izolovaných z pupočníku alebo s neurónmi izolovanými z ganglií zadných koreňov.
- 3) Využitie dvoch typov modelov poškodenia miechy na potkanoch: lézia pomocou hemisekcie s vytvorením dutiny a balónkom-indukované tlakové poškodenie
- 4) *In vivo* experimenty na akútnej lézii po hemisekcii - injekcia ECM hydrogélů.

- 5) *In vivo* experimenty na akútnych léziách miechy potkanov s implantáciou hydrogélom HA-PH-RGD zosieťovaných vopred *in vitro* alebo *in situ* v lézii alebo implantácia suspenzie hWJ-MSK v hydrogéle.
- 6) *In vivo* experimenty na subakútnych léziách miechy injekciou HA-PH-RGD, HA-PH-RGD/F s/bez WJ-MSK,
- 7) *Intrathekálne podanie mezenchymálnych kmeňových buniek* z pupočníka v rôznych dávkach
- 8) *Transgénna aktivácia $\alpha 9$ -integrínu a kindlinu 1* a stimulácia rastu neuritu u DRG neurónov na fibríne modifikovanom oligopeptidom AEIDGIEL, na laminine a laminine s agrekanom.

V dizertačnej práci boli použité tieto **metódy**: WST-1 esej, histologické a imunofluorescenčné farbenie, analýza vrastania axónov, kapilár, makrofágov a oligodendrocytov, analýza tvorby a plochy gliálnej jazvy, meranie dĺžky neuritu, kvantifikácia bielej a šedej hmoty, analýza génovej expresie pomocou kvantitatívnej real-time PCR, meranie koncentrácie protoplazmatických astrocytov, behaviouralne testy: BBB test, rotarod test, beam walk test, vyšetrenie lokmočných funkcií pomocou prístroja MotoRater, transfekcia buniek, charakterizácia fenotypu hWJ-MSK buniek pomocou Flow cytometrie.

Výsledky práce: Dizertačná práca Mgr. Kekulovej nadväzuje na celosvetový výskum regeneratívnej medicíny v oblasti nervového tkaniva, autorka systematicky a komplexne hodnotí jednotlivé materiály, či prístupy. Dizertačná práca prináša nové poznatky ohľadom dynamiky hojenia poranenia miechy s použitím hydrogélom, rýchlosť a rozsah tvorby jazvy, rýchlosť degradácie materiálu pri hojení, poznatky o vrastaní rozličných typov buniek a expresii génom, tvorby špecifických bunkových markerom, ako i výsledky pohybových testom laboratórnych potkanom a štatistické hodnotenie.

Ako **pozitívum** vidím komplexnosť metodiky, použitie nových biotechnologických, či chemických pripravených materiálov, ktoré majú spravidla

štandardné vlastnosti a nevyvolávajú silnú imunitnú reakciu a majú najväčšiu šancu sa dostať do praxe. Dôležité je aj zistenie optimálnej dávky kmeňových buniek a potreba ich opakovaného podania na optimalizáciu účinku. Transgénná aktivácia $\alpha 9$ -integrinu a kindlinu 1 u neurónov prispieva k riešeniu problému inhibičného pôsobenia zložiek medzibunkovej hmoty v gliálnej jazve.

Nedostatky: Chýba charakterizácia materiálov z hľadiska fyzikálno-chemických vlastností, ktorí sú podstatné pre interakciu bunka-materiál a sú východiskom použitia konkrétneho materiálu pre danú aplikáciu.

Formálne spracovanie dizertačnej práce je na vysokej úrovni, je prehľadná s obrázkami, písaná po anglicky, veľmi zrozumiteľne. Na začiatku každej podkapitoly je stručná obrázková schéma jednotlivých experimentov, čo zvyšuje prehľadnosť. Na konci podkapitol sa nachádzajú dielčie súhrny najdôležitejších zistení.

Práca má štandardné členenie, celkový rozsah bez príloh 79 strán, obsahuje 148 citácií, Ciele a hypotézy sú uvedené 2x, na konci práce s uvedením, či boli splnené.

Publikácie: Mgr. Kristýna Kekulová je autorkou 3 publikácií vzťahujúcich sa k téme izertácie, z toho je prvá autorka jednej publikácie. Všetky 3 práce sú publikované v kvalitných odborných časopisoch s impakt faktorom. Ďalej je spoluautorkou ďalších 5 publikácií a jednej kapitoly v knihe, ktoré sa podľa autorky nevzťahujú k téme.

Dizertačná práca Mgr. Kristýny Kekulovej spĺňa požiadavky na dizertačnú prácu a dokazuje schopnosť autorky samostatne vedecky pracovať a publikovať výsledky. Preto doporučujem dizertačnú prácu k obhajobe a **doporučujem Mgr. Kristýne Kekulovej udelenie titulu Ph.D.**

Doplňujúce otázky:

Neuróny transfekované plasmidom CAG- α 9-V5, CAG-kindlin 1-GFP boli následne farbené protilátkami proti V5 a GFP. Prečo? GFP nesvieti dostatočne? Čo znamená skratka V5? Nie je v zozname skratiek.

Skúsili ste kombináciu kindlinu a α 9 integrinu? Podľa publikácie Menghon Cheah (*et al.* 2016, *Expression of an Activated Integrin Promotes Long-Distance Sensory Axon Regeneration in the Spinal Cord. The Journal of Neuroscience*, 2016, 36(27):7283–7297) ich kombinácia účinkovala synergicky na rast axónov in vivo po poškodení miechy u potkana. Súčasne sa regenerácia zvyšovala medzi 3., 6. a 12. týždňom. Je otázka, či by nebolo vhodné predĺžiť štúdie na viac ako obvyklých 8 týždňov. Mohlo by to mať pozitívny vplyv na výsledky behaviourálnych testov? Pomohla by napr. aj určitá rehabilitácia potkanov podobne ako u ľudí?

Pri podaní rôznych dávok hWJ-MSK ste najlepší výsledok pozorovali po 6 týždňoch. Predpokladáte zlepšenie aj po dlhšom časovom intervale aj keď sa kmeňové bunky v defekte pravdepodobne už nenachádzajú? Ako dlho je potrebné podávať imunosupresívne lieky?

Zvyšuje sa rozdiely v hojení poškodenia miechy zvierat napríklad s ich vekom?

Vypracovala:

v Prahe dňa: 22.2.2019

Mgr. Elena Filová, Ph.D.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.