



Jana Balounova Ph.D.
Head of Immunology Unit
Phenotyping Module
Czech Centre for Phenogenomics
Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v. v. i.
Prumyslova 595
CZ252 50 Vestec
Czech Republic
e-mail: jana.balounova@img.cas.cz | Phone: +420 325 873 219

V Praze, 24.5. 2022

Posudek diplomové práce: Modulační působení kmenových buněk na buňky imunitního systému zprostředkované mitochondriálním transferem

Předložená, relativně úsporná práce, vypracovaná v českém jazyce, je standardně členěna a klade si za cíl srovnat MSC a SC z hlediska jejich schopnosti mitotransferu a jeho vlivu na splenocyty, a popsání mechanismu mitotransferu do jednotlivých populací splenocytů. Velice pozitivně hodnotím, že se autorka v rámci svého studia experimentálně podílela na přípravě článku *“Sertoli Cells Possess Immunomodulatory Properties and the Ability of Mitochondrial Transfer Similar to Mesenchymal Stromal Cells”*, nedávno zveřejněného v časopise *Stem Cell Reviews and Reports* (Porubská et al., 2021).

Po formální stránce je práce napsaná dobrou češtinou s minimem překlepů či nepřesností.

Autorka cituje celkem 121 relevantních zdrojů, zahrnujících původní a přehledové články, doporučení odborné společnosti a kapitoly z knihy. V seznamu použité literatury jsou přehledové články označeny hvězdičkou, u některých však hvězdička chybí (Song et al., 2020, Fan et al., 2020, Keller et al., 2020, Sylvester et al., 1994). Domnívám se, že na str. 3 je zaměněna citace přehledového článku (Fan et al., 2020 vs Mishra et al., 2020). V některých případech, by myslím bylo korektnější citovat původní publikace nebo uvést, že se jedná o citaci review přímo v textu.

Stěžejní analytickou metodou pro dosažení výsledků je průtoková cytometrie, kterou autorka jistě dobře ovládá. V práci se objevil i jeden mikroskopický obrázek, který však vykazuje nedostatky ve zpracování a rozhodně není vyveden v publikační kvalitě.

Název práce si klade velmi ambiciózní úkol, a to popsat modulační mechanismy kmenových buněk na splenocyty zprostředkované mitochondriálním transferem, samotnou imunomodulací, tj např. vlivem na aktivaci či tolerizaci leukocytů, se však experimentálně nezabývá.

Závěrem autorka konstatuje, že dochází k přenosu mitochondrií jak z MSC, tak ze SC do čtyř subpopulací splenocytů. Míra přenosu mitochondrií ze SC je nižší než z MSC a mitotransfer mezi MSC/SC a SPL je obousměrný, přičemž mitochondrie přenášené do MSC/SC jsou pravděpodobně nefunkční.

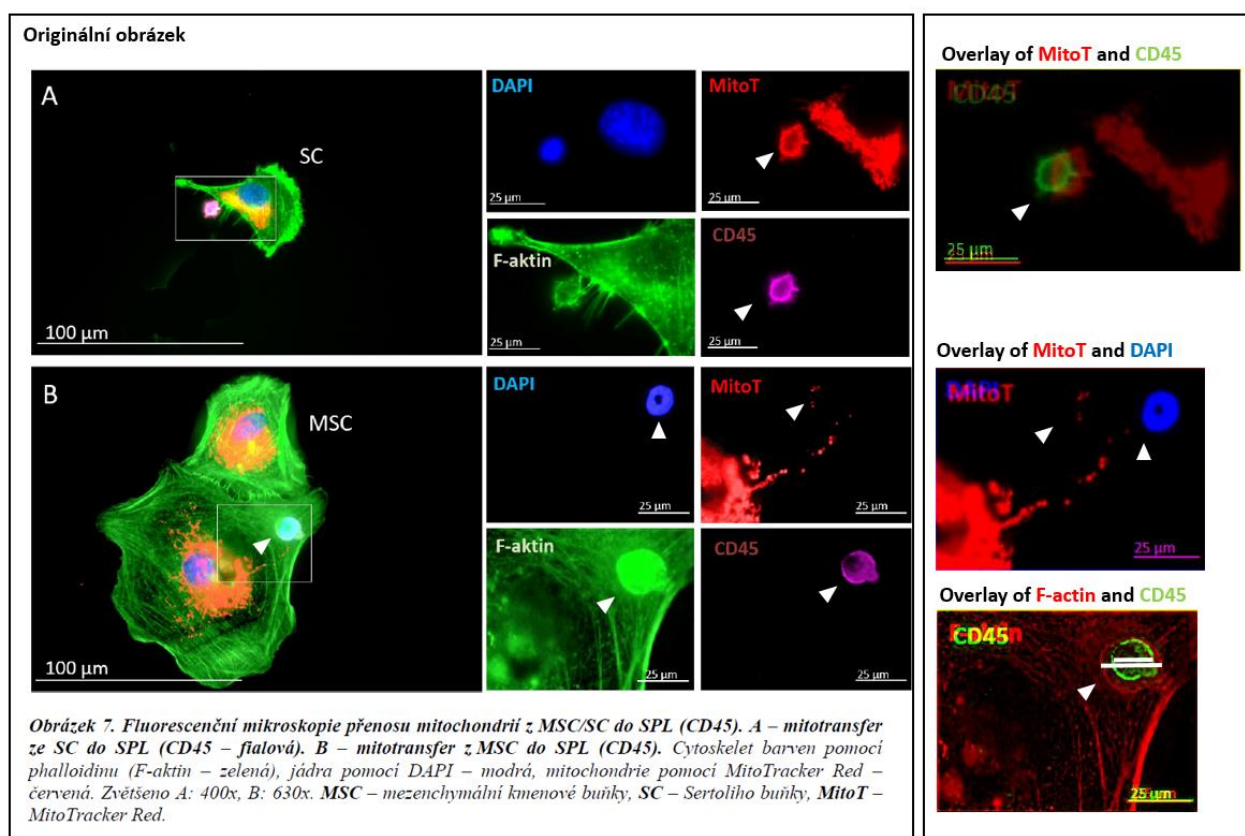
Téma práce – modulační vlastnosti MSC a SC a jejich mechanismy- je velmi komplexní a zajímavé, a domnívám se, že literární rešerše je v některých bodech poněkud střídá a čtenář neznalý tematiky někdy postrádá návaznosti. Některá tvrzení by zasloužila podrobnější vysvětlení.

Str.2 „...působení MSC není ve všech případech jednoznačně protizánětlivé. Záleží totiž na tom, jak dlouho zánět probíhá a taky na mikroprostředí, ve kterém se MSC nachází (Aggarwal et al., 2005; Jiang et al., 2020)....“



K práci mám řadu doplňujících dotazů a komentářů:

1. Technicky ne zcela zdařilý obrázek 7 si klade za cíl demonstrovat mitotransfer z MSC a SC do leukocytů na příkladu **jednoho** leukocytu. Po technické stránce je obrázku je patrné, že jednotlivé kanály nebyly extrahovány z jednoho původního více-kanálového obrázku (odlišné zvětšení, rozdílné rozměry, posun jednotlivých obrázků). Zcela chybí jakákoliv statistika. V případě panelu B (MSC) dokonce buňky leží na sobě, což zcela znemožňuje stanovit, zda mitochondrie skutečně patří leukocytu či MSC. Využití wide field mikroskopie je v tomto typu experimentu problematické a pro korelaci prostorové distribuce bych doporučila použít mikroskopii konfokální.



2. Mitochondriální transfer může probíhat různými způsoby buď závislými na přímém mezibuněčném kontaktu (TNT, jiný přímý kontakt buněk), či parakrinně (Li et al., 2019). Ve vašem systému však nepozorujete parakrinní přenos mitochondrií. Máte nějaké vysvětlení pro odlišnosti v chování těchto dvou experimentálních modelů?
3. Jaký byste navrhla způsob detekce mitotransferu, aby bylo možné odlišit přenos přes TNT od jiné formy mezibuněčného kontaktu? Jaké kontroly byste navrhla použít?
4. Jak byste stanovila mitotransfer bez použití mitodyes a jaké výhody či nevýhody by tento přístup měl?
5. Z obrázku 10 není patrné, zda jsou Annexin V pozitivní buňky zároveň pozitivní i na Hoechst 33258, můžete okomentovat distribuci buněk procházející časnou a pozdní fází apoptózy?



6. Na obrázku 14 ukazujete, že kultivace splenocytů s oligomycinem či rotenonem nevede ke zvýšení produkce ROS. V následném experimentu (obr. 16) jste indukovali produkci ROS ve splenocytech pomocí H_2O_2 a měřili účinnost mitotransferu. Zaujalo mě, že aplikace jak induktoru ROS - H_2O_2 , tak i antioxidantu – NAC, či jejich kombinace vedla obvykle ke snížení mitotransferu. Měření ROS ukázalo, že kultivace s H_2O_2 skutečně vede ke zvýšení ROS a inkubace s NAC k jich snížení. Kombinace obou vedla k obdobným koncentracím ROS jako u neovlivněných splenocytů. Jakou spojitost mezi přítomností ROS a mitotransferem vyvozujete z tohoto experimentu?
7. Jak si představujete prakticky využitelný terapeutický potenciál SC, které, dle mého názoru, představují relativně problematicky dostupný zdroj kmenových buněk (oproti například tukové tkáni).
8. Jaký význam má případný mitotransfer do leukocytů, jako buněk pohyblivých s obvykle relativně krátkou délkou života, a které jsou snadno nahraditelné v porovnání např s dlouho žijícími neurony či kardiomyocyty, u kterých může snadno dojít k poškození stresem a následně tedy mohou benefitovat z přenosu funkčních mitochondrií z MSC?

Práce i přes drobné, výše zmíněné nedostatky prokazuje autorčinu schopnost zpracovat literární rešerši, provádět experimentální práci a dokumentovat a diskutovat její výsledky. Gratuluji studentce ke spoluautorství nadávno publikovaného článku (Porubská et al., 2021) a práci doporučuji k obhajobě bez větších výhrad.

Mgr. Jana Balounová, Ph.D.