

# Oponentský posudek na diplomovou práci

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

**Autor:** Bc. Julie Vacková

**Název práce:** Mechanismy působení imunosupresivních látek na mezenchymální kmenové buňky.

## **Cíle práce:**

Cílem diplomové práce je ověřit vliv vybraných imunosupresivních látek na diferenciaci, přežívání a metabolickou aktivitu mezenchymálních kmenových buněk (MSC). Taktéž určit vliv imunosupresivních látek na expresi molekul, které hrají významnou roli v imunomodulačních mechanismech a to na modelu myších MSC izolovaných z tukové tkáně a lidských MSC izolovaných z tukové tkáně a kostní dřeně *in vitro*.

Vzhledem k tomu, že MSC a jejich využití ve velkém počtu klinických studií je aktuální oblast výzkumu, téma a cíle diplomové práce jsou velmi vhodně zvolené.

## **Struktura (členění práce):**

Členění práce je standardní, práce taktéž obsahuje přílohy, které srozumitelně a přehledně shrnují získané výsledky. Rozsah práce: 64 stran vlastního textu.

## **Literární přehled:**

Literární přehled odpovídá tématu, je napsán srozumitelně, autorka použila dostatečný počet literárních zdrojů. V práci bylo citováno 115 prací. Autorka ve své práci cituje taktéž elektronické dokumenty (webové stránky), ale ty nejsou uvedeny v seznamu literatury (<https://clinicaltrials.gov>, [http://osiris.com/OLD/clinical\\_prochymal.php](http://osiris.com/OLD/clinical_prochymal.php), [http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/organ\\_transplantation](http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/organ_transplantation)).

V literárním přehledu postrádám úvod do problematiky, kde by byl zmíněn význam a přínos této práce.

Podle mého názoru kapitola 1.2 Využití MSC v klinických studiích by měla následovat až po kapitole 1.3 Imunomodulační mechanismy MSC. Je vhodnější nejprve popsat vlastnosti MSC a pak na základě daných vědomostí psát o jejich klinickém využití.

Mám připomínku ke kapitole 1.2.2 Autoimunitní onemocnění, kde autorka uvádí pouze tabulku příkladů klinických studií využívajících k léčbě MSC. Podle mého názoru by si daná kapitola zasloužila textovou část uvádějící, proč se MSC využívají při léčbě autoimunitních onemocnění.

### **Materiál a metody:**

Použité metody odpovídají experimentální kapitole. Jednotlivé metody jsou většinou srozumitelně popsány, ale s řadou nedostatků, které budou uvedeny v připomínkách.

### **Experimentální část:**

Autorka ve své práci srozumitelně popisuje cíle jednotlivých experimentů, získané výsledky jsou přehledně zdokumentovány.

Za nedostatek této části považuji neuvedení počtu technických a biologických opakování, přestože jsou měřené hodnoty doplněny o směrodatné odchylky.

Další nedostatky budou shrnuty v připomínkách.

### **Diskuse:**

Autorka v diskusi dává získané výsledky do kontextu s literaturou, ale jde spíše o konstatování než porovnávání. Podle mého názoru v diskusi by měly být více rozvedeny příčiny rozdílů získaných výsledků.

### **Závěry (Souhrn):**

Závěry jsou přehledné a výstižné, přispělo k tomu i uvedení příloh na konci práce, kde jsou výsledky shrnuty do přehledných tabulek.

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

Grafická úroveň práce je velmi dobrá, ale mám několik připomínek, které uvádím níže. Stylizace českého abstraktu má prvky anglicky stylizovaného textu a navíc překlad není vždy přesný.

Práce je sice psaná srozumitelně, ale v některých pasážích se vyskytují stylistické neobratnosti. I proto čtení není vždy plynulé, úprava a stylizace textu by si podle mého názoru vyžadovaly ještě více úsilí.

V textu je pár překlepů, v některých případech chybí čárky apod.

## Otázky a připomínky:

Některé příklady drobných nedostatků a nepřesností:

- 1) Podle mého názoru by Seznam použitých zkratk vyžadoval lepší formátování, protože není moc přehledný.
- 2) Věnovat větší pozornost uvádění kompletního názvu kapitol. (Příklad: kapitola 1.1 Fenotyp. Správně by mělo být uvedeno Fenotyp mezenchymálních kmenových buněk.)
- 3) Slovní spojení „*et al.*“ není psáno kurzívou, rovněž „*in vivo*“ v jednom případě.
- 4) U některých vět chybí citace. Např: „Imunosupresivní látka CsA byla poprvé izolována z houby *Tolypocladium infantum* v roce 1970.“ (str. 21); „V organismu je MFF rychle metabolizován na MPA a glukuronid MPA a vylučován z těla tělními tekutinami (viz obrázek 7)“ (str. 22); nebo věty v prvním odstavci v kapitole Diskuse.
- 5) V tabulce 8 chybí uvedení protilátky CD54 (ICAM-1).
- 6) V některých případech popis osy y zasahuje do stupnice osy (obr. 20, 22B), taktéž popisy osy y nejsou rovnoběžné u grafů, které jsou pod sebou (obr. 17, 22, 33, 34). Obr. 18B má nepřehledné znázornění signifikancí (p value).
- 7) U obr. 6 zůstalo původní označení „A“ z literárního zdroje, ale v práci není nutné a navíc překrývá zobrazenou chemickou strukturu.

## Připomínky:

- 1) Některé věty v české a anglické verzi abstraktu nejsou obsahově shodné.  
Po krátkodobé kultivaci imunosupresivní látky různě ovlivňují metabolickou aktivitu, přežívání a expresi významných molekul pro imunosupresi MSC.  
Here we show that MSC from various sources are affected differentially after short-term exposure of the tested immunosuppressants.  
  
Většina imunosupresivních látek měla inhibiční efekt na studované parametry myších MSC a pouze cyklosporin A fenotyp a přežívání myších MSC neměnil.  
Only cyclosporine A does not change immune-related parameters of mice MSC in the comparison to other immunosuppressants.
- 2) Nerozlišování zkratk proteinů a genů, geny nejsou psány kurzívou.
- 3) V metodě Diferenciace adipogenní a osteogenní je uvedeno, že MSC byly kultivovány s imunosupresivními látkami ve 24-jamkové destičce a po dosažení diferenciace byly zafixovány a obarveny Oil Red O a Alizarin Red. Byla na tuto metodu použita speciální destička na mikroskop se skleněným

dnem, která není v popisu zmíněná, nebo v metodě chybí popsání toho, že na dně každé jamky v destičce byly krycí sklička, na kterých byly MSC kultivovány?

- 4) V metoda 3.7 Izolace RNA chybí popsání centrifugace buněk po kultivaci, popis metody začíná až odebráním supernatantu a přidáním jednotlivých chemikálií. Taktéž není zmíněno následné vytvoření 2 fází po centrifugaci a přenesení vodní fáze do nové eppendorfky. V metodě je popsáno, že pelety byly na konci sušeny 5 min při 39 °C. Je daná teplota správně uvedena?
- 5) V metodě Izolace RNA chybí stanovení koncentrace RNA, její stability a čistoty. Uvedte, prosím, v jakém rozpětí se dané hodnoty pohybovaly.
- 6) Metoda 3.8 Reverzní transkripce úplně postrádá postup/provedení. Jsou vyjmenovány jenom reagentie formou odrážek. Jako 4. odrážka v pořadí je 65 °C 5 minut, můžete, prosím, upřesnit význam tohoto popisu? Znamená to smíchání prvních 3 reagentů a inkubace za daných podmínek?
- 7) Na základě čeho byl vybrán *GAPDH* jako referenční gen pro metody RT-PCR a qPCR?
- 8) Nejsou uvedeny přesné hodnoty p value v textu (kapitola Výsledky).
- 9) V práci jsou časté neúplné popisy/legendy k obrázkům. Chybí vysvětlení zkratk (např. obr. 6, 10, 31), uvedení jednotek pro použitou koncentraci imunopresivních látek (obr. 20, 21, 22, 23, 24, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36).
- 10) Ani v jednom popisu k obrázku není uveden počet opakování pokusů, přestože jsou výsledky doplněny o směrodatné odchylky.
- 11) Při popisu osy y u výsledků z průtokové cytometrie je nutné uvádět, že se jedná o % pozitivních buněk na daný znak a ne pouze Annexin V %, % Fas-L atd. U metody ELISA při popisu osy y se jednotky koncentrace daného cytokinu uvádějí v hranatých závorkách po názvu cytokinu.

Otázky:

- 1) Jaké různé postupy se používají na zlepšení migrační aktivity MSC na požadované místo po jejich systémovém podání? Proč je málo efektivní proces migrace MSC po systémovém podání, z jakých vlastností MSC to vyplývá? Jaký vliv na migraci MSC má samotná kultivace a následné zpracování buněk, centrifugace, použití trypsinu?

- 2) Kam nejčastěji migrují MSC po systémovém podání? Má podání MSC rovněž pozitivní účinek, i když nedojde k migraci do požadovaného místa určení?
- 3) V čem se mezi sebou liší lidské MSC izolované z tukové tkáně a kostní dřeně?
- 4) Jak vypadá dot plot VCAM-1 pozitivních lidských MSC izolovaných z tukové tkáně, kde uvádíte, že VCAM-1 exprimují jenom 2 % populace, v porovnání s dot plotem VCAM-1 pozitivních buněk lidských MSC izolovaných z kostní dřeně? Prosím ukázat jednotlivé populace formou dot plotu.
- 5) V práci uvádíte (str. 11) tuto větu: „V někteřích studiích léčby akutní GvHD, kdy byli pacienti rezistentní k imunosupresivním látkám, nebyli jedinci léčeni imunosupresivními látkami v době podání MSC (Muroi et al., 2015).“ Uveďte, prosím, výsledky této studie.
- 6) V kapitole Diskuse je uvedeno (str. 64): „Množství IL-6, které produkují nestimulované MSC nebo MSC stimulované IFN- $\gamma$  by pravděpodobně nemělo být dostatečné pro navození fenotypu Th17.“ Z čeho vychází dané konstatování (není uvedena citace)?

### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Julie Vacková předložila k obhajobě celkově kvalitní diplomovou práci s aktuálním a zajímavým tématem. Zároveň bych chtěla vyzdvihnout vědecký přínos dané práce. Autorka získala důležité výsledky nejen o celkovém vlivu působení imunosupresivních látek na mezenchymální kmenové buňky, ale navíc získala i významné výsledky popisující rozdíl mezi myšími a lidskými MSC a rovněž rozdílů mezi lidskými MSC získanými z různých zdrojů (kostní dřeň a tuková tkáň). Za získanými výsledky je vidět velké pracovní úsilí a nasazení.

Ale na druhé straně práce obsahuje formální nedostatky, které sice samy o sobě nejsou až tak závažné, ale s přihlédnutím na celý souhrn připomínek práce budí dojem, že jejímu dokončení mohlo být věnováno ještě trochu víc času a úsilí.

Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě a navrhuji celkové hodnocení velmi dobře.