

Oponentský posudek na doktorskou dizertační práci

Název: Mesenchymální kmenové buňky a jejich regenerační a imunomodulační potenciál

Autor: MUDr. et Mgr. Michaela Miklíková

Oponent: RNDr. Vratislav Horák, CSc.

Práce byla vypracována v Ústavu histologie a embryologie a v Biomedicinském centru Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova v Praze pod vedením Doc. MUDr. Daniela Lysáka, Ph.D. a konzultantky Ing. Lucie Vištejnové, Ph.D. Práce má standardní členění o celkovém rozsahu 150 stran, z čehož zhruba třetinu představuje pět příloh, které dokumentují publikační aktivity autorky.

Zvolené téma dizertační práce považuji za velmi aktuální, neboť mesenchymální kmenové buňky (MSCs) představují jedinečný biologický nástroj pro široké využití v různých oblastech medicíny. Přes více než půl století jejich výzkumu vedoucího k neustálé kumulaci experimentálních dat a přes řadu nadějných výsledků z preklinických a klinických zkoušek existuje kolem MSCs ale stále řada bílých míst, které je nutné objasnit, než se přistoupí k jejich rutinní aplikaci pacientům. Autorka se zaměřila na tři možné oblasti využití MSCs – na sledování jejich účinku na prasečí kardiomyocyty *in vitro*, na regeneraci jater u nově vytvořeného prasečího modelu chronického jaterního onemocnění a na analýzu imunomodulačního efektu MSCs na úrovni *in vitro* a také u pacientů s nemocí typu reakce štěpu proti hostitelovi (GVHD).

Literární přehled v úvodu práce se podrobně zabývá problematikou MSCs, jejich úlohou v organismu a vlivu na imunitu, možností izolace MSCs z různých tkání, jejich kultivace *in vitro* a využití při regeneraci tkání včetně podrobného výčtu výsledků z klinických zkoušek především pokud jde o regeneraci srdce, jater a aplikaci při GVHD. Celý literární přehled je zpracován velmi přehledně a zahrnuje aktuální informace z nejnovějších odborných publikací. Následuje jasná formulace pěti cílů dizertační práce. Pro jejich splnění musela autorka zvládnout rozsáhlé spektrum metod, které jsou v souladu s vytčenými cíli a jsou podrobně popsány v další části práce. Dosažené výsledky přinášejí poznatky o úspěšné izolaci prasečích a lidských MSCs a jejich charakterizaci, o izolaci a charakterizaci prasečích kardiomyocytů a sledování vlivu MSCs na viabilitu a fyziologické vlastnosti kardiomyocytů při kokultivaci *in vitro*, o účinku aplikace MSCs na regeneraci jaterní tkáně u prasečího modelu na základě sledování morfologie a morfometrické analýzy jater a kvantifikace čtyř vybraných cytokinů a o imunomodulačním působení MSCs na stimulované lidské lymfocyty *in vitro* a na subpopulaci T lymfocytů (regulační T lymfocyty – Tregs; pomocné T lymfocyty (Th1, Th2 a Th17) u pacientů s GVHD. V diskusní části práce jsou autorkou zjištěné výsledky kriticky porovnávány se současnými poznatky o MSCs a nakonec jsou stručně a přehledně shrnuté. Závěr práce představuje rozsáhlý přehled citované literatury.

Předložená dizertační práce představuje rozsáhlou studii zaměřenou na problematiku MSCs, jejich izolace, charakterizace a využití u prasečího modelu a u pacientů s GVHD. Práce přinesla původní nové poznatky a splnila sledované cíle. Přes drobné nepřesnosti a překlepy, kterým se při takovémto rozsahu nedá zcela vyhnout, považuji práci za velmi kvalitní. Je nutné také vyzdvihnout, že je sepsána v angličtině, což zatím není obvyklé.

Na druhé straně jsem značně překvapen tím, že k této doktorské dizertační práci při předkládání k obhajobě není doložen prvoautorský článek s dosaženými výsledky již opublikovaný v impaktovaném odborném časopisu nebo alespoň přijatý do tisku do takového časopisu, což je běžně požadováno. Neznám ale podrobně interní předpisy a požadavky Lékařské fakulty v Plzni pro předkládání doktorské dizertační práce a tak nevím, zda je tato skutečnost takovým nedostatkem, který by mohl negativně ovlivnit obhajobu této dizertační práce.

K práci mám následující dotazy a připomínky:

1. Autorka uvádí, že prasečí MSCs byly izolované z kostní dřeně dospělých prasat (str. 45, ř. 10). Jaké to představuje stáří zvířat, o jaké plemeno se jednalo a kolik zvířat bylo pro izolaci použito? Proč nebyla v pokusu použita mladší zvířata (např. selata po odstavu), která by mohla – s ohledem na údaje uvedené v literárním přehledu na str. 31 – poskytnout kvalitnější MSCs? Jaké stáří prasat si mám představit pod termínem „young adult pigs“ (str. 49, ř. 9), který je uvedený při izolaci kardiomyocytů?
2. Pro pokusy s prasečími MSCs byly použité buňky z druhé až osmé pasáže (str. 45 dole). Dlouhodobější pasážování buněk kultivovaných *in vitro* může vést ke změnám jejich proliferační i diferenciací kapacity. Bylo v tomto směru provedeno porovnání MSCs z různých pasáží? Proč nebyly použité prasečí MSCs jen z určité pasáže?
3. Na str. 50, ř. 4 (ale i jinde např. str. 52, ř. 10) je uvedeno, že vyhodnocení procenta živých kardiomyocytů po jejich izolaci provedl zkušený pozorovatel. Znamená to, že na této části experimentální práce se autorka nepodílela?
4. Při testování vlivu MSCs na lidské lymfocyty *in vitro* byla použita délka kokultivace obou typů buněk 6 hodin. Proč byla zvolena tato doba kokultivace? Je to dostatečně dlouhý interval na to, aby se projevil nějaký výraznější imunopresivní efekt MSCs na stimulované lymfocyty?
5. Na str. 62 jsou velmi stručně společně popsány výsledky izolace prasečích a lidských MSCs a jejich charakterizace. Mezi prasečími a lidskými MSCs nebyly ve sledovaných parametrech pozorované vůbec žádné rozdíly? Jaké MSCs – prasečí nebo lidské – představuje fotodokumentace na str. 63, obr. 6 a obr. 7?
6. Obr. 11 a obr. 12 na str. 68 dokumentují fluorescenční barvení mitochondrií kardiomyocytů kultivovaných jeden a tři dny samostatně a v kokultuře s MSCs. Když pomínu skutečnost, že obrázky při menším zvětšení (obr. 11A a E, obr. 12A a E) jsou velmi nekvalitní a neukazují téměř žádný výsledek, tak při detailnějším zobrazení (obr. 11C a G, obr. 12C a G) je jasně patrné výraznější fluorescenční barvení kardiomyocytů, které byly kultivované samostatně jeden i tři dny. Znamená to, že toto barvení prokazuje lepší mitochondriální funkci kardiomyocytů kultivovaných samostatně? Není to v rozporu s výsledky analýzy respirační funkce mitochondrií (str. 71, obr. 15), které ukazují naopak vyšší hodnoty při kokultivaci kardiomyocytů s MSCs? Obr. 11C a obr. 12C podle textu k obrázkům dokumentují fluorescenci jednotlivého kardiomyocytu. Je možné, aby kardiomyocyt měl čtyři jádra, jak je patrné z těchto obrázků (uvádí se obvykle jedno, případně dvě jádra)?
7. Popis hodnot nalezených při sledování respirační funkce mitochondrií na str. 70, ř. 4-6) neodpovídá legendě k obr. 15A (str. 71).
8. Autorka uvádí (str. 60-61), že u pacientů s GVHD byl pozorován průtokovou cytometrií vliv aplikace MSCs na zastoupení Tregs a pomocné T lymfocyty (Th1, Th2 a Th17). Ve výsledcích na str. 80, obr. 21 pak ukazuje, jak bylo provedeno gatování na Tregs. Zajímalo by mě, jak autorka dělala gatování na subpopulaci pomocných T lymfocytů Th1 a Th2. Na str. 61 píše, že pomocné T lymfocyty pozitivní na IL-4 byly považované za buňky Th1 a pomocné T lymfocyty pozitivní na IFN- γ byly považované za buňky Th2. Tato úvaha je však zcela chybná. Jestliže podle ní autorka postupovala při analýze výsledků průtokové cytometrie, pak musela nutně dojít k mylným závěrům.

9. U obr. 22 (str. 81) a obr. 23 (str. 82) postrádám, v jakých jednotkách jsou hodnoty na ose y uvedené. V textu k obrázkům je uvedeno, že se jedná o počet bílých krvinek (A), počet všech lymfocytů (B), časové změny počtu Tregs CD25⁺CD127⁻ (C) a Tregs CD4⁺FOXP3⁺ (D). Jak autorka tyto počty stanovila?

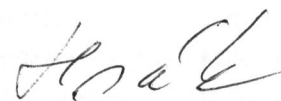
V textu k obrázkům E, F a G je naopak uvedeno, že se jedná o hladiny IL-4, IFN- γ a IL-17. Tato formulace, která se obvykle používá při kvantifikaci cytokinů, tak navozuje mylný dojem. Stejně tak nepřesné jsou formulace na str. 79, odst. 3 a 4, ve kterých autorka popisuje výsledky průtokové cytometrie, při které byly protilátky proti uvedeným cytokinům použité pro stanovení zastoupení subpopulací Th1, Th2 a Th17 v periferní krvi. Nelze tedy výsledky interpretovat tak, že po aplikaci MSCs se produkce IL-17 snížila nebo že hladiny IL-4 a IL-17 v krvi pacientů se zvýšily a hladiny IFN- γ snížily.

10. Analýza vlivu MSCs na regeneraci jater u prasečího modelu přinesla ve sledovaných parametrech (morfometrická analýza, kvantifikace čtyř cytokinů) jen drobné a neprůkazné rozdíly mezi skupinami zvířat s aplikací MSCs a bez nich. Proč byl pokus ukončen již po čtrnácti dnech, když sama autorka v diskusi (str. 86, odstavec dole) zmiňuje, že neuspokojivé výsledky by mohly být způsobené příliš krátkou dobou sledování?

ZÁVĚR:

Přes výše uvedené připomínky považuji předloženou dizertační práci MUDr. et Mgr. Michaely Miklíkové za velmi kvalitní a splňující požadavky uvedené v § 47 odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách. Autorka v ní jasně prokázala schopnost samostatné tvůrčí a vědecké činnosti. Na základě toho doporučuji předložit dizertační práci k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení udělit MUDr. et Mgr. Michaely Miklíkové titul Ph.D..

V Liběchově 12. 8. 2016



RNDr. Vratislav Horák, CSc.
Laboratoř biologie nádorů
ÚŽFG AV ČR v.v.i.
Rumburská 89, 277 21 Liběchov