

Téma dizertační práce: **Kultivace limbálních a mezenchymálních buněk na různých typech nosičů pro využití v oftalmologii**

The culture of limbal and mesenchymal cells on various feeders for their use in ophthalmology

Autor: Mgr. Peter Trošan
Školitel: Doc. Mgr. Kateřina Jirsová, Ph.D.
Pracoviště: Laboratoř biologie a patologie oka
Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN
Albertov 4, Praha 2, 128 01
tel.: +420 224 96 80 06, e-mail: katerina.jirsova@lf1.cuni.cz

Posudek školitele

Mgr. Peter Trošan pracuje v Laboratoři biologie a patologie oka, Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN od roku 2015, do laboratoře přišel již se znalostmi základních laboratorních metod buněčné a molekulární biologie a okamžitě se zapojil do experimentální práce. Vzhledem k tématu dizertační práce se Peter věnoval zejména dvěma oblastem výzkumu: kultivaci buněk pro potenciální léčbu deficience limbálních kmenových buněk (LSCD) a přípravě amniové membrány, zejména její deepitelizaci pro následné použití v tkáňovém inženýrství.

Z použitých laboratorních metod se Peter věnoval především

- izolaci a separaci buněk a jejich následné kultivaci,
- molekulární charakteristice kultivovaných buněk (genová exprese, imunohistochemická detekce proteinů),

příčemž v laboratoři zavedl a standardizoval použití i některých metod, které si osvojil na předchozím pracovišti, např. Wst-1, rtPCR.

Schopnost nastudování příslušné problematiky, samostatnost, značná manuální zručnost, pracovitost, komunikativnost a schopnost zapojit se rychle do pracovního týmu a běžících projektů Petrovi umožnily vznik studií, které posunují studovanou tematiku (příprava limbálních kmenových buněk pro léčbu LSCD) od experimentu k možnému využití v klinické praxi. Peter po celou dobu studia přistupoval k práci zodpovědně, aktivně, s jasnou představou jak na základě získaných výsledků dále postupovat. Peter experimenty nejen sám prováděl, ale získaná data zpracovával jak statisticky, obrazově tak do publikační podoby.

Formální stránka dizertační práce:

Dizertační práce Mgr. Trošana je psaná anglicky, obsahuje 66 stran textu se všemi doporučenými náležitostmi (úvodní strana, čestné prohlášení, identifikační záznam a abstrakty v českém a anglickém jazyce, výčet použitých zkratk). Práce je členěna do následujících kapitol: předmluva, úvod, hypotézy a cíle, materiál a metody, výsledky, diskuze, souhrn a reference. Další část práce tvoří šest příloh – jednotlivé publikace autora, které vznikaly během jeho doktorandského studia.

Literární úvod obsahuje souhrn podstatných poznatků o rohovce, deficienci limbálních kmenových buněk, její léčbě, kultivaci limbálních epitelových buněk a amniové membráně. Cíle a hypotézy jsou představeny stručně a srozumitelně. Metody jsou uvedeny v dostatečném rozsahu, autor jasně definuje, které metody pro studie používal a tím pádem definuje i svůj podíl na jednotlivých člancích. Výsledky jsou představeny srozumitelně a doplněny o

dokumentační obrázky. Diskuse je přehledná, logicky rozdělená na dvě části, první je věnována přípravě buněk pro léčbu LSCD, druhá přípravě amniové membrány. Převzaté údaje jsou patřičně citovány dle pravidel citační etiky. V textu disertační práce je začleněno 20 obrázků, kterým odpovídá patřičný odkaz v textu. V disertační práci je uvedeno 237 citací.

Obsahová stránka dizertační práce:

Hlavním cílem dizertační práce Mgr. Trošana byla příprava buněk použitelných v léčbě unilaterální i bilaterální LSCD, tj. onemocnění, které vede k částečné či úplné ztrátě zraku. Během jeho studia vzniklo 6 impaktovaných publikací (P1-P6).

Mgr. Trošan nejdříve dokončil práci na diferenciaci myších mezenchymálních kmenových buněk pomocí inzulínu-podobnému růstového faktoru-1 na buňky podobné rohovkovým epitelovým buňkám (**P3 v dizertační práci**) a následně se podílel na přípravě protokolu pro kultivace limbálních epitelových buněk bez použití xenogenních médií (**P1**). Výsledkem této studie je metoda využívající pro kultivace sérum pacienta a jako substrát fibrinové lepidlo, tedy schválené léčivo. Vzhledem k tomu, že léčba LSCD pomocí buněčné terapie není v České republice dosud zavedena, plánujeme ji předložit SÚKLu ke schválení pro přípravu buněk pro transplantace v léčbě LSCD. Výsledky výše uvedených studií byly publikovány v časopisech s IF < 3, tj. časopisech spadajících do Q1 v příslušném oboru. Dalším výstupem, na kterém se Peter podílel zejména stanovením exprese kmenových a proliferačních márků a márků charakterizujících jednotlivé buněčné typy byla kultivace spojivkového epitelu obsahující jak epitelové tak pohárkové buňky (**P2**).

Dále Peter začal samostatně pracovat na koncepci přípravy deepitelizované amniové membrány (AM) pro následující kultivaci limbálních epitelových buněk. Pro deepitlizaci použil různé typy enzymů s cílem odstranit všechny epitelové buňky, ale zároveň nepoškodit strukturu bazální membrány. Druhým výstupem této studie je metoda kultivace vitálních epitelových buněk, které mohou být dále použity např. pro přípravu kondicionovaného média (**P6**). Na vylepšení přípravy AM pro transplantační účely se Peter podílel i v dalších studiích (**P4 a P5**).

Mgr. P. Trošan má smysl pro týmovou práci, ale zároveň umí pracovat samostatně. Předkládaná disertační práce a zejména výsledky v uvedených publikacích svědčí o jeho pracovní aktivitě a schopnostech vědecky pracovat. Peter se ve sledované problematice dobře orientuje a dosažené výsledky připravuje k publikacím v zahraničních impaktovaných časopisech a k prezentacím na domácích a zahraničních konferencích samostatně. Na mezinárodní konferenci získal cenu za nejlepší poster (EEBA, 2017).

Vědecká práce Mgr. P. Trošana v rámci doktorandského studia splňuje všechny podmínky a náležitosti pro udělení titulu Ph.D.

Doc. Mgr. Kateřina Jirsová, Ph.D.

Laboratoř biologie a patologie oka

Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN

Albertov 4 Praha 2, 128 01

tel.: +420 224 96 80 06, e-mail: katerina.jirsova@lf1.cuni.cz

V Praze, dne 31.3.2019

Podpis: