



## Oponentský posudek na diplomovou práci

**Název práce:** Vliv statinů na polarizaci makrofágů *in vitro*

**Jméno autora(ky):** Bc. Barbora Muffová

**Oponentka:** Doc. RNDr. Magdaléna Krulová Ph.D.

Předložená diplomová práce se zabývá sledováním vlivu fluvastatinu na makrofágy diferencované z monocytů lidské periferní krve. Téma práce je relevantní a zajímavé, a přesto že nastavení projektu na podmínky *in vitro* a využití makrofágů polarizovaných z monocytů periferní krve zcela neodpovídá podmínkám v živém organismu, přináší důležité informace.

V literárním přehledu jsou shrnuty základní znalosti o ateroskleróze a působení makrofágů v jejím rozvoji a dále působení statinů na buňky imunitního systému. Tato část je zpracována důkladně, zahrnuje potřebné informace. Neobsahuje však ani jeden obrázek, dokumentující informace. Uvítala bych například znázornění mechanismu působení statinů, nebo rozdělení populací makrofágů – zde by obrázky usnadnily pochopení textu. Další zásadní výtkou je kvalita jazyka práce. Je zde přítomná řada anglicizmů, v některých větách čeština pláče. (Například: „Antiinflamační efekt statinů byl prokázán i přímo na lidech. Byl demonstrován snížením produkce ...“, „Výše zmíněné a další studie demonstrovaly schopnost statinů favorizovat Th2 imunitní odpověď ...“ „... byli-li statinové terapii vystaveni dárce“). Špatná úroveň českého jazyka provází bohužel celou diplomovou práci.

V části Materiál a metody jsou popsány metodické přístupy využívané v experimentální práci. Přestože počet dárců je uveden na začátku kapitoly Výsledky, patří spíše do kapitoly Materiál a metody. Zde výrazně chybí upřesnění kohorty dárců – věk, pohlaví apod., vzhledem k tomu že dané faktory mohou ovlivnit získané výsledky. Byla práce na vzorcích lidské krve schválena etickou komisí?

I v této kapitole pochopení textu snižují některé nepřesnosti. Předpokládám, že peleta buněk nebyla rozpuštěna, ale naředěna. Autorka uvádí, že „do každé jamky byl přidán 1 ml buněčné suspenze ( $150 \cdot 10^3$ – $250 \cdot 10^3$  buněk/jamka) s 80 ng/ml M-CSF pro diferenciaci monocytů v makrofágy“. Znamená to, že diferenciaci probíhala v různé koncentraci buněk? Následná polarizace do M1, případně M2 fenotypu probíhala nadále v jamkách s různou koncentrací buněk? A supernatant pro určení koncentrace NO a cytokinů byl získán také z buněk kultivovaných v různé koncentraci? To by jistě vedlo k neporovnatelným výsledkům. Autorka dále uvádí (v kapitole 6), že: „pro potřeby qPCR bylo na jamku vysazeno  $50 \cdot 10^3$  –  $250 \cdot 10^3$  buněk, v závislosti na výtěžnosti separace monocytárních buněk“. Z toho není jasné, zda buňky z jednoho dárce byly kultivovány v takto odlišných koncentracích. Nedomnívá se autorka, že by odlišné koncentrace mohly ovlivnit

expresi některých genů? Je opravdu možné takto získané výsledky srovnávat? Uvádění hodnot ve formátu  $150 \cdot 10^3$  je nepřehledné.

Je popsán protokol barvení buněk pro měření pomocí průtokové cytometrie, ale v práci není ukázána gatovací strategie, ani příslušné FMO kontroly. Není proto možné zjistit, zda měření bylo provedeno správně. Při obhajobě by toto mělo být ukázáno.

V kapitole 4.4.2 autorka uvádí, že „Izolovaná RNA byla, podle vyizolovaného množství, nejprve naředěna adekvátním množstvím  $H_2O$  tak, aby celkový objem tvořil  $8 \mu l$ ” Předpokládám, že to znamená, že RNA byla naředěna, tak aby všechny vzorky byly ve stejné koncentraci? Jaké? Dále je v kapitole 4.4.3 uvedeno: „Před samotnou reakcí byla nejprve získaná cDNA zředěná sterilní  $H_2O$ . cDNA je nutno před reakcí zředit tak, aby její množství bylo optimální pro správné proběhnutí PCR reakce a aby nedošlo v důsledku velké, nebo naopak nízké koncentrace nukleové kyseliny ke zkreslení výsledků.“ Jaká tedy byla použitá koncentrace cDNA?

Autorka některé metody popisuje velmi podrobně, například u Griessovy metody je uvedeno i schéma (mimořádně je to jediný dokumentační obrázek v celé práci), naopak u kvantifikace cytokinů je pouze uvedeno, že bylo postupováno podle přiložených protokolů.

V části Výsledky autorka dokumentuje získané výsledky. Získané výsledky jsou dokumentovány 4 grafy a 10 obrázky. Není jasné, proč jsou některé výsledky označovány jako Obrázek a některé jako Graf. Jaký je mezi nimi rozdíl?

Popis Grafu 1 není jasný, co znamenají hodnoty uvedené v popisu? Jde o signifikantně odlišné výsledky? V tom případě by chybělo označení v grafu.

V kapitole 6.2 uvádí autorka v textu řadu hodnot, včetně směrodatných odchylek aby demonstrovala působení statinů. Uvádění značné řady čísel v textu není přehledné, navíc jsou tyto hodnoty uvedeny v tabulce, takže dochází k duplikaci a ještě většímu snížení přehlednosti. Úplně by stačilo data shrnout do tabulky a potom se na tuto tabulku dále odkazovat.

Toto platí i pro kapitolu 6.3, kde jsou změny v expresi genů pro jednotlivé znaky uváděny pouze jako číselné hodnoty v textu a navíc bez uvedení co daná čísla znázorňují, tedy jak je exprese vyjádřena – to autorka zmiňuje pouze v úvodu kapitoly. Příklad textu: „Graf A obr. 8 ukazuje signifikantně vyšší expresi genu NFkB u M1 ( $105 \pm 45,72$ ) makrofágů oproti subpopulacím M0 ( $1,040 \pm 0,3205$ ) a M2 ( $0,3585 \pm 0,143$ )“.

V některých případech mají grafy ze získaných výsledků velký rozsah osy, takže jsou osy přerušeny, což je obecně vhodně zvolený postup. Bohužel u některých obrázků dochází tímto přerušením k vymazání směrodatné odchylky, takže není vidět její rozsah (např. Obrázek 10B). U obrázku 10A není ve sloupci M1 + statin vidět žádná směrodatná odchylka, přestože autorka udává hodnoty  $342,8 \pm 524,9$ .

Kapitola Diskuze je podrobná a pečlivě zpracovaná. Je rozdělena na dvě části, v první části autorka diskutuje zvolený model a kroky optimalizace, v druhé části potom samotné výsledky. Bohužel i v této kapitole je možné nalézt řadu nedostatků. V první části autorka uvádí, že “Dle dostupné literatury nejsou buňky THP-1 linie ani pod vlivem stejných cytokinů (tedy IFN $\gamma$ +LPS pro M1 populaci a IL-4+IL-13 pro M2 populaci) schopny uspokojivě mimikovat vlastnosti makrofágů

diferencovaných z monocytů periferní krve.“ (Tedesco et al., 2018). S obtížnou reprodukovatelností výsledků získaných na buněčné linii u primárních buněk je jistě možné souhlasit. V diskuzi je však potřeba zmínit kromě publikací potvrzující problémy s diferenciací THP-1 linie i publikace, které uvádějí, že jejich protokoly pro diferenciaci THP-1 buněk fungují (např. Baxter et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN $\gamma$ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. 2020, Journal of Immunological Methods).

V druhé části diskuze jsou podrobně diskutovány získané výsledky, v některých případech se snahou zahrnout případné mechanismy působení statinů. Zde mi však chybí širší pohled na studované téma (viz některé doplňující otázky).

S autorkou nesouhlasím v názoru na nejzávažnější limitaci diplomové práce. Nemyslím si, že výsledky získané využitím buněčné linie by měly větší vypovídající hodnotu. Primární buňky lépe odrážejí realitu, přestože výsledky nedosahují signifikance.

Autorka v diplomové práci použila dostatečné množství literárních zdrojů, 16 sekundárních citací je označeno pouze v textu, nikoliv u samotných citací.

V předložené diplomové práci autorka prokázala znalost řady laboratorních technik. Získané výsledky nebyly v kontextu světové literatury dosud popsány. Autorka tak prokázala schopnost získávat, interpretovat a diskutovat výsledky. Nicméně v diplomové práci je řada nejasností a nepřesností. Možnost obhajoby této práce tak bude do značné míry závislá na výkonu autorky při samotné obhajobě.

Doplňující otázky:

1. V práci je vyjmenována řada pozitivních účinků statinů v klinické praxi. Mají statiny také nežádoucí vedlejší účinky?
2. Autorka uvádí že: „koncentrace Fluvastatinu (10 mM) byla převzata ze studie Fu et al., 2019 a je v souladu i s výsledky studie McFarland et al., 2017“, nicméně ve studii Fu et al je použita koncentrace 10 ug/ml a ve studii McFarland et al 2017 koncentrace 0.001 – 100uM. Je známa farmakokinetika po podání Fluvastatinu pacientům? Je zvolená koncentrace relevantní?
3. Jak si autorka vysvětluje nárůst koncentrace NO u M0 a M1 populace po 96 hodinách?
4. Bylo snížené přežívání M2 makrofágů (viz Graf 2) potvrzeno i v literatuře?

5. V kapitole 6.5 je uvedeno, že vzorky byly měřeny v duplikátech nebo tetraplikátech. Může autorka upřesnit, které vzorky byly stanovovány v duplikátech a které v tetraplikátech a proč nebyly všechny vzorky měřeny stejně?
6. U M2 populace jsou při měření průtokovou cytometrií patrné dvě hodnoty se signifikantně nižší expresí řady znaků, včetně CD14. Jedná se o stále stejné dárce? Pokud ano, jsou tito dárce něčím specifití? Byli u těchto dárců získány nižší hodnoty i v ostatních metodických přístupech (ve kterých jsou výsledky uváděny pomocí sloupcových grafů, takže jednotlivé hodnoty nejsou zřejmé)?
7. Jaké je zastoupení jednotlivých populací makrofágů (M1 a jednotlivých populací M2) v aterosklerotickém plátu? Jaké je zastoupení makrofágů derivovaných z monocytů a jaké „tissue-resident“ makrofágů? Byl popsán rozdíl v odpovědi těchto odlišných populací makrofágů na působení statinů (nebo jiných léčiv)?
8. Autorka uvádí, že si práce klade za cíl zjistit, zda statiny ovlivňují polarizaci makrofágů. V práci však byly používány již polarizované makrofágy, takže tento cíl nemohl být naplněn. Mohou tedy statiny ovlivnit samotnou polarizaci? Jakými mechanismy? Působení statiny stejně na monocyty i makrofágy?
9. V Závěru práce autorka uvádí, že statiny výrazně ovlivňují metabolismus makrofágů. Na jakých konkrétních výsledcích je toto tvrzení založeno?

V Praze dne 17.5.2022

Doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Katedra buněčné biologie, PřF UK