

## OPONENTSKÝ POSUDEK

disertační práce "*Regenerative Medicine in Ocular Surface Reconstruction: Advancing Cell-Based Therapies for Limbal Stem Cell Deficiency*"

Autor: Joao Victor de Sousa Cabral, MD

Předložená disertační práce je sepsána v anglickém jazyce, má tradiční členění. V úvodu jsou popsány změny rohovky související s deficiencí limbálních kmenových buněk, onemocnění oka, k jehož léčení má disertační práce přispět a uveden je i přehled současných terapeutických modalit. Dále je popsána struktura rohovky, podrobně jsou uvedeny charakteristiky limbálních epitelových kmenových buněk (LESCs) a epitelových buněk ústní sliznice (OMECs). V závěru úvodní stati jsou popsány podmínky pro *in vitro* kultivaci těchto buněk, hodnocení možné genotoxicity související s kultivací a jejich kryoprezervace. Následující vymezení hypotéz a cílů práce zahrnuje 4 konkrétní problémové okruhy, které byly řešeny. Jedná se zejména o modifikaci vlastností kultivovaných LESCs působením IL13 a při kultivaci na různých typech substrátu, optimalizaci *in vitro* podmínek pro kultivaci OMECs pro následnou transplantaci a zlepšení podmínek kryoprezervace pro jejich dlouhodobé uchování. Posledním cílem bylo zjištění účinku v mrazu uchované amniové blány (AM) na hojení ran ve vztahu k jejímu dárci (interplacentární variabilitě).

Oddíl Materiál a metodika uvádí široké spektrum metodických přístupů, odpovídající požadavkům na kvalitní práci. Podrobně jsou popsány podmínky pro *in vitro* kultivaci obou buněčných typů, příprava kultivačních substrátů, metody pro morfologické hodnocení a molekulární analýzy kultivovaných buněk a metody statistického hodnocení získaných výsledků.

Následující část práce podrobně popisuje získané výsledky, z nichž je možné vyzvednout zejména zjištění, že IL13 sice zvyšuje „kmenovost“ *in vitro* kultivovaných limbálních epitelových buněk (LEC), ale zároveň zvyšuje expresi spojivkových markerů, což je efekt nežádoucí. Pozoruhodné je zjištění vlivu substrátu na změnu fenotypu kultivovaných LEC, buňky kultivované na PDLLA s fibronectinem vykazovaly transdiferenciaci k mezenchymálnímu fenotypu; tento nálezn je impulzem pro hledání jiných možností složení substrátu pro kultivaci LEC. K dalším pozoruhodným výsledkům patří optimalizace protokolů pro kultivaci OMECs a podmínek pro dlouhodobou kryokonzervaci těchto buněk a v neposlední řadě v klinické studii potvrzení výhodnosti použití kryokonzervované amniové blány pro hojení ran a možnosti jejího použití jako vhodného substrátu pro kultivaci buněk.

V připojeném seznamu literárních referencí je uvedeno 323 odkazů na převážně recentní odborné články.

K předložené práci nemám žádné výhrady. Téma je nesporně aktuální, jak rozsah práce, tak spektrum použitých metod zcela odpovídají přijatým požadavkům. Výsledky přinášejí nové poznatky, které byly

publikovány v mezinárodních odborných časopisech s IF. Seznam těchto pěti publikací je v práci uveden, in extenso jsou připojeny v příloze. Uveden je i seznam dalších tří prací k publikaci již odeslaných nebo připravených.

#### **Otázky:**

1. V práci popisující *in vitro* kultivaci limbálních epitelových buněk jsou uváděny jednak limbální epitelové buňky (LECs), jednak limbální epitelové kmenové buňky (LESCs). Znamená to, že v primární kultuře (P0) je směs LECs a LESCs a jejich zastoupení se v průběhu kultivace (P1, P2) nebo změnou kultivačních podmínek mění? Jedná se o selekční tlak nebo o změnu genové exprese původních LECs?
2. Ve studii uvádějící kultivaci OMEC je zmíněna vhodnost porovnání vlastností a funkčnosti OMEC s dalšími buněčnými typy, například s buňkami vlasových folikulů. Je známo, že tyto folikulární epitelové buňky úzce kooperují s mezenchymálními buňkami papily vlasové cibulky. Nemohou být vlastnosti folikulárních epitelových buněk izolovaně kultivovaných *in vitro* ovlivněny absencí příslušných buněk mezenchymálních?

#### **Závěr:**

Práce splňuje jak po stránce obsahové, tak po stránce formální, všechna požadovaná kritéria, přináší významné doplňující poznatky o podmínkách kultivace LESCs a přispívá k optimalizaci techniky kultivace OMECs a jejich kryokonzervace.

**Autor prokázal, že je schopen vědecké problémy formulovat a samostatně řešit a že má všechny předpoklady k další samostatné tvořivé vědecké práci. Disertační práci hodnotím jednoznačně kladně a doporučuji ji k obhajobě. Zároveň doporučuji, aby byl autorovi předložené práce po úspěšně provedené obhajobě udělen titul „Ph.D.“ za jménem.**

V Praze, 15. 9. 2023

Prof. MUDr. Václav Měsíček, CSc.

Ústav patologie UK-3  
Šrobárova 50  
100 34 Praha 10