

Oponentský posudek disertační práce

Studentka: Mgr. Natálie Kudlová

Název disertační práce: Modely senescence a jejich využití při identifikaci senolytik

Posudek zpracoval: RNDr. Karel Koberna, CSc., Ústav molekulární a translační medicíny,
Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Disertační práce Mgr. Natálie Kudlové se zabývá optimalizací a validací postupu testování potenciálních senolytických látek na *in vivo* a *in vitro* modelech. Jedná se rozsahem o obsáhlou disertační práci, ve které se autorka na 216 stranách zabývá tématem senescence. Toto téma představuje v současnosti jednu z aktuálních společenských a vědeckých výzev díky zaměření na zvýšení kvality života stárnoucí lidské populace a současně možnému využití některých poznatků v protinádorové terapii.

Práce je uspořádána do logických celků. Abstrakt je přehledný, jednotlivé řešené okruhy jsou jasně pojmenované a výsledky práce jsou lehce identifikovatelné.

Teoretický úvod zahrnuje několik podkapitol. Ty jsou dále přehledně členěny a dovolují si utvořit obraz o soudobém stavu poznání v oblasti výzkumu senescence. Je to mimo jiné díky širokému zaměření této části. Úvod pokrývá současný stav poznání od biomarkerů senescence a možností jejich detekce, přes vybrané modely senescence až po přehled senolytických a senotoxických látek a jejich působení včetně použití senolytik v protinádorové terapii.

Cíle práce jsou jasně vymezeny a jsou zcela v souladu s dalšími kapitolami. Cíle zahrnují mimo jiné optimalizaci buněčného akcelerovaného radiačního modelu senescence a jeho použití pro identifikaci potenciálních senolytik, optimalizaci a validaci neinvazivního odběru myších chlupů pomocí nové přístrojové technologie a jejich použití pro výzkum senescence a testování vybraných potenciálních senolytik na přirozeném replikativním myším modelu senescence.

Stat' věnovaná metodice je rovněž přehledně napsaná a umožňuje vytvořit si jasnou představu o provedených experimentech.

Část disertace, která se zabývá výsledky, je vhodně členěná podle cílů, což usnadňuje orientaci v textu. Výsledky prokázaly, že jednotlivé cíle byly beze zbytku splněny. Jako významný přínos práce považují kromě optimalizace jednotlivých modelů především identifikaci nových potenciálních senolytických látek. Silnou stránkou je rovněž statistické zhodnocení veškerých dosažených výsledků.

V kapitole Diskuse jsou výsledky vhodně diskutovány a uvedeny do souvislostí s relevantními výsledky z jiných studií.

Závěr obsahuje shrnutí dosažených výsledků a jen dále umocňuje jasnost a přehlednost celé práce.

Nedílnou součástí disertace jsou i přiložené články v impaktovaných časopisech, kde je autorka ve dvou případech uvedena na první pozici. Jedná se celkem o tři články, přičemž jejich tematické zaměření je v souladu se zaměřením celé disertace.

Moje připomínky se týkají převážně méně věrného překladu některých částí abstraktu, stylistických změn a některých překlepů. Např. v anglické verzi abstraktu chybí překlad v českém abstraktu uvedeného slova „tkání“; dále namísto „Although“ v 5. řádku abstraktu by bylo vhodnější použít slovo „Nevertheless“, namísto spojení „adaptován z“ v legendě některých obrázků by bylo vhodnější použít spojení „převzat“, případně „upraven“ nebo jejich spojení. Na straně 19 (1. řádek

nad obrázkem 6) namísto „detekována“ použít „detekováno“, na straně 24 (1. řádek nad tabulkou 1) namísto výrazu s „přiloženými“ je vhodnější výraz „uvedenými“.

U tabulky 1 na str 24 by bylo vhodné uvést reference, u téže tabulky je u biomárků BrdU a EdU vhodnější uvést jako detekční metodu AC – afinitní cytochemii, jelikož u těchto dvou biomárků je možná jejich detekce nejen pomocí protilátek a fluorescence, ale rovněž v případě BrdU pomocí peroxidázy nebo fosfatázy a pomocí klik reakce v případě EdU.

Věta na str 31 (začátek 2. odstavce) je nejasná, chybí podmět?

Str 74 (3. řádek odspodu) zřejmě vinou automatických oprav je slovo „Jistým“ psáno chybně s velkým počátečním písmenem.

Strana 92, obr. 31 - namísto „v jiných“ by byl vhodnější výraz „v různých“.

Uvedené připomínky ale nijak nesnižují obsahovou kvalitu práce. Navíc většinu z mých připomínek běžný čtenář pravděpodobně ani nezaznamená.

Ačkoli je disertační práce psána srozumitelně a odpovídá na většinu otázek, přesto bych měl na její autorku několik dotazů:

- 1) Na straně 9 (4. řádek od konce) je uvedeno, že v senescenci dochází ke zploštění a zvětšení buněk. U legendy k obrázku 2 je uvedeno, že mezi biomarkery silně svázané se senescencí a pozorované u většiny senescentních buněk patří změny velikosti a tvaru. Byl tento znak patrný u všech hodnocených vzorků? Je tento znak hodnotitelný i u suspenzních buněk? Jakou metodu by autorka doporučila pro hodnocení těchto změn a jedná se o změnu, která je patrná u celé populace buněk, nebo jen u její části, případně jak byla velká tato část u hodnocených vzorků?
- 2) Na straně 13, řádek 8 je uvedeno, že senescentní buňky opouští cyklus na hranici G1/S nebo G2/M. Je něco známo o faktorech, které rozhodují, kdy dojde k opuštění cyklu?
- 3) Na straně 54 je uvedeno, že byla označena cytoplazma. Byla vybrána automaticky nebo manuálně? Pokud automaticky, jaké parametry byly použity pro její identifikaci?
- 4) Autorkou identifikované látky S1, S2, S3 s potenciálním senolytickým účinkem patří do skupiny nukleosidů. Existuje představa o mechanismu jejich účinku např. ve srovnání s diskutovaným prekurzorem 5-fluoruridinu (strana 109)?

Práce Mgr. Natálie Kudlové **splňuje** požadavky kladené na disertační práci. Proto ji **doporučuji** k obhajobě.

V Olomouci, dne 27. 9. 2022

RNDr. Karel Koberna CSc.
Ústav molekulární a translační medicíny
Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

**Laboratoř biologie nádorové buňky, Ústav biochemie a experimentální onkologie
1 lékařská fakulta, Univerzita Karlova**

U Nemocnice 5, Praha 2, 128 53

Doc. MUDr. Petr Bušek, Ph.D., Tel.: +420-2-2496 5825, 5748, email: petr.busek2@lf1.cuni.cz

www.lf1.cuni.cz/lbnb



Oponentský posudek dizertační práce

Modely senescence a jejich využití při identifikaci senolytik

Autor: Mgr. Natálie Kudlová
Vedoucí práce: Doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Předložená dizertační práce Mgr. Kudlové se zabývá ustanovením modelů senescence a jejich následným využitím pro studium potenciálně senolytických látek *in vitro* a *in vivo*. Vychází ze tří článků publikovaných v časopisech s IF- dvou prvoautorských (review v Int. J. Mol. Sci., IF 6,208, Q1, originální článek v Aging-US, IF 5,955, Q2) a jednoho článku v roli spoluautora (Stem Cells Int., IF₂₀₁₈ 3,902, Q2). Dle přiložené bibliografie je předkladatelka spoluautorem dalších dvou článků v časopisech s IF a jedné kapitoly v knize.

V rámci prvního cíle autorka optimalizovala model radiací indukované senescence pro potřeby vysokokapacitního testování. Linie po vystavení ionizujícímu záření vykazovaly morfologické změny a docházelo k charakteristické akumulaci lipofuscinu. Kvantifikace autofluorescence lipofuscinu se však neukázala jako dostatečně spolehlivý nástroj pro testování senolytik.

Senolytický účinek byl proto testován jednak s použitím MTS testu a dále autorkou optimalizovanou kvantifikací SA-beta-galaktosidasové aktivity pomocí obrazové analýzy.

Těmito přístupy byl potvrzen možný senolytický účinek řady známých sloučenin a především byly identifikovány kandidátní nově nasyntetizované senolytické látky (v textu z důvodu plánované patentové ochrany anonymizovány kódy S1-S3). V rámci cíle dvě autorka prokázala, že minimálně invazivní odběr myších chlupů pomocí nově navrženého zařízení umožňuje využít myší folikulární buňky k izolaci nukleových kyselin a též ke studiu senescence. V rámci cíle tři byly s využitím tohoto modelu otestovány látky S1-3 vybrané na základě *in vitro* testů a byl prokázán jejich (byť časově značně omezený) senolytický efekt. Vytyčené cíle se podařilo naplnit, zavedená metodika byla využita v přiložených publikacích. Autorka prokázala možné senolytické účinky látek S1-3 (dle textu se jedná o modifikované nukleosidy). Posledně uvedené výsledky nebyly dosud publikovány, je plánována jejich patentová ochrana.

Téma práce je aktuální, senescentní buňky se podílí na patogenezi řady onemocnění souvisejících se stárnutím a přispívají k patogenezi nádorových onemocnění. Z tohoto důvodu jsou senolytika velmi zajímavou skupinou látek, která má potenciální využití u řady těchto onemocnění včetně maligních nádorů. Přínos práce spatřuji v optimalizaci metodiky pro vysokokapacitní testování potenciálních senolytik, za velmi přínosné dále považuji zavedení a validaci metody na odběr myších chlupových folikulů, která umožňuje získat minimálně invazivním způsobem a opakovaně materiál pro další studie (demonstrováno na příkladu genotypizace, imunofluorescenční detekce proteinů a qRT-PCR analýzy genové exprese).

Práce je psána česky, je standardně členěna, zahrnuje 146 stran textu včetně 263 převážně recentních referencí. Dále jsou přiloženy publikace, ze kterých práce vychází, a suplementa. Výsledky jsou doloženy tabulkami, grafy a mikrofotografiemi, za velmi přínosné považují schematické znázornění experimentálního přístupu např. v rámci cíle 1.

Jazyková úroveň je velmi dobrá. Text obsahuje drobné nepřesnosti či některá možná až přílišná zjednodušení (např. metaloproteiny z matrix- zřejmě MMP, opakovaně používané spojení „replikativní model senescence“ či i „replikativní model“ - spíše „model replikativní senescence“, str. 25 „přepnutí na on režim vede k emisi detekovatelného spektra světla“, str. 26 nemožnost vizualizovat NIR sondy pomocí MRI či PET nebude zřejmě záviset jen na jejich „nízké schopnosti penetrace“, poněkud nesourodá charakterizace látek v tabulce 7), ty však nebrání celkově dobré srozumitelnosti textu. V některých místech výsledkové části by však bylo pro větší přehlednost vhodné u prováděných experimentů stručně zmínit jejich cíl a klíčové parametry zvolené metodiky (např. 4.1.6). Přestože je tyto údaje možné dohledat v části Materiál a metody, text by byl pro čtenáře „přívětivější“.

Mám několik kritických připomínek k prezentaci výsledků

- Grafy, u kterých osa Y nezačíná nulou, sice lépe ilustrují pozorované rozdíly, ale poněkud zkreslují prezentovaná data. Použití osy s jasně vyznačeným přerušením je v tomto případě vhodnější (obrázek 21).
- Obsáhlé tabulky 12, 14, S1 zaměřující se především na p hodnotu jsou poněkud nepřehledné, přispívá k tomu mj. velký počet desetinných míst u zobrazených hodnot. Kromě statistické významnosti je důležitým parametrem velikost pozorované změny, což např. z tabulek S1 není možné vyčíst. Závislost odpovědi na dávce je obtížně posouditelná i v tabulkách 12 a 14.
- U mikroskopických obrázků by mělo být uvedeno měřítko, údaj o použitém zvětšení je v případě digitálních fotografií málo informativní.
- Pro porovnávání více skupin a opakovaných měření jsou vhodnější ANOVA či její neparametrické formy spíše než t-test (např. obrázek 36, 39).

Otázky, které ve mne četba dizertační práce vyvolala:

- Rozdíly v IC₅₀ u některých látek testovaných MTS testem, které jsou označeny jako potenciálně senolytické, je poměrně malý (Tabulka 11, např. u MRC5 pro quercetin 10,77 vs 16,2 uM a MCOPPB 6,55 vs 8,33 uM pro senescentní resp kontrolní kultury). Podporují zdrojové křivky závislosti odpovědi na dávce závěr, že jsou tyto látky senolytické? Kontrolní buňky jsou aktivně proliferující, zatímco senescentní buňky zřejmě proliferují jen málo. Přepokládáte, že ke změně v počtu viabilních buněk detekovaných MTS testem dochází stejným mechanismem (zánik buněk, ovlivnění proliferace...)?
- Výsledky MTS testu a SER spot analýzy pro experimentální látky S1 a S3 jsou ve většině případů zcela opačné (Tabulka 11, 12, S2), obě látky jsou vysoce toxické pro nádorové buňky, u senescentních nádorových buněk je toxicita výrazně nižší. Jak si to vysvětlujete? Tabulka 12 dokumentuje pokles procentuálního zastoupení senescentních buněk, mění se vlivem testovaných látek i celkový počet buněk?
- Přestože je značná část dizertační práce poměrně metodicky zaměřená, není metodika SER spot analýzy a její optimalizace příliš detailně popsána. Demonstrujte prosím např. na datech z obrázku 24. Čemu odpovídají kontroly v obrázku 24 (uvedena jedna hodnota,

testovány tři různé linie)? Byla vyšší senescence buněk určena pomocí SER spot analýzy po ozáření 3x 10 Gy ve srovnání s jednorázovou dávkou 10 Gy potvrzena nezávislou metodou?

- Obrázek 37 poukazuje na nárůst exprese p21 po aplikaci ionizujícího záření. Dochází však i ke změnám v neozářené končetině, které jsou (snad s výjimkou dne 28) v podstatě identické. Jak spolehlivým markerem je p21 v tomto modelu a čím si vysvětlujete změny v neozářené končetině?
- Podání látek S1-S3 v modelu ionizujícím zářením akcelerované senescence *in vivo* vede pouze ke krátkodobé změně exprese *p16* a *p21*. Jakým mechanismem si změny a jejich přechodný efekt vysvětlujete? V závěru je zmíněn cytotoxický efekt vůči stárnoucím buňkám *in vivo* (str. 112)- plánujete tento závěr podpořit nějakou další metodou?
- V úvodu mě zaujala zmínka, že digoxin a ouabain mají potenciál ovlivnit senescentní buňky. Dochází k tomu v koncentracích dosahovaných při klinickém použití digoxinu, ev. podporují tuto možnost data např. od pacientů užívajících digoxin z kardiologické indikace?

Závěr: I přes výše uvedené drobné nedostatky předložená práce spolu s publikační aktivitou autorky prokazuje její schopnost vědecké práce. **Práci doporučuji k obhajobě jako součást požadavků na udělení titulu Ph.D.**

V Praze 4.10.2022

doc. MUDr. Petr Bušek, Ph.D.