

## **Oponentský posudek disertační práce**

*Mgr. Aleny Morávkové*

### ***Ontogeneze B lymfocytů u vybraných veterinárních druhů savců***

Hlavním tématem práce je studium ontogeneze lymfocytů B u prasat. Výsledky získané u prasat jsou srovnávány se situací u psů a práce je značným přínosem k poznání ontogeneze lymfocytů u těchto dvou živočišných druhů, které jsou velmi významné z hlediska teoretické i aplikované imunologie a medicíny a dosavadní informace o vývoji jejich imunitního systému jsou ve srovnání se situací u lidí a laboratorních hlodavců poněkud kusé. Studium vývoje lymfocytů prasat a psů je značně ztíženo nedostatkem komerčních imunoreagencií.

Práce je napsána klasickým způsobem s dělením na úvod, metody, výsledky, diskusi a závěry a je doložena dvěma publikacemi v zahraničních časopisech. U třetí přiložené práce je Mgr. Morávková první autorkou, ale práce se týká jiné problematiky – nádorové imunologie. Tuto heterogenitu předkládané disertační práce nepokládám za závadu, protože vím, že byla způsobena změnou pracoviště, ke které došlo z příčin autorkou nezpůsobených. Domnívám se však, že i tato práce měla být v disertaci doplněna komentářem.

Se současným stavem problematiky nás seznamuje přehledný úvod. Cíle práce jsou jasně formulované. Autorka při své práci zvládla řadu moderních a náročných metod – práci s experimentálními zvířaty, různé způsoby izolace buněk, kultivace buněk, přípravu monoklonálních protilátek a s ní související imunoenzymatické a elektroforetické metody. V největší míře je však celá práce postavena na výsledcích průtokové cytometrie a je patrné, že autorka má s touto metodou značné zkušenosti. Proti diferenciačním znakům u prasat a psů je k dispozici daleko menší množství monoklonálních protilátek než proti nejčastěji studovaným znakům u lidí a myši. Autorce se nepodařilo připravit další vhodné monoklonální protilátky, ale důmyslně využila mezidruhových křížových reaktivit. Část studia byla provedena v mezinárodní spolupráci, což jistě autorku obohatilo o cenné zkušenosti.

Studium prasat přineslo několik zajímavých původních výsledků: K identifikaci B buněčné linie v kostní dřeni prasat byly využity křížově reagující protilátky proti intracelulární části lidského CD79 $\alpha$ . Různá stadia ontogenetického vývoje prasečích B buněk byla charakterizována pomocí velikosti buněk a pomocí znaků CD79 $\alpha$ , CD2, SWC3 a MHC II. Bylo prokázáno, že exprese CD2, již dříve popsána na povrchu prasečích lymfocytů B, předchází expresi membránového IgM. Časnými prekursory B lymfocytů jsou buňky CD79 $\alpha$ + SWC3+ IgM-. Během další diferenciaci mizí exprese SWC3. Nejčasnějšími prokázanými prekursory jsou patrně buňky CD2+SWC3+, z jejichž části se během kultivace s buňkami thymového stromatu diferencují buňky CD45+ mIgM+. Na základě těchto a dalších výsledků byla vytvořena jasná a přehledná hypotéza o cestě diferenciaci hematopoetických kmenových buněk prasat ke zralým lymfocytům B.

Srovnání se situací u psů odhalilo některé překvapující podobnosti v ontogeneze B lymfocytů psů a prasat a ukázalo, že znak SWC3 je možné u obou druhů pokládat za specifický znak časně lymfopoézy.

V diskusi jsou výsledky shrnuty a vhodně komentovány ve vztahu k nejrůznějším literárním údajům. Rozsah bibliografie ukazuje na dobrou orientaci autorky v oboru. Nebylo by na škodu uvést stručné srovnání studované diferenciaci B lymfocytů u prasat a psů s diferenciací B lymfocytů u nejčastěji studovaných a používaných lymfocytů lidí a laboratorních hlodavců.

Práce je provedena srozumitelně a úhledně, ale je v ní více drobných formálních chyb, chyby v číslování a popisování obrázků a přeházené stránky v jedné z příložených publikací. Domnívám se, že by bylo lépe psát „receptor pro antigen“ než „antigenní receptor“. Na str. 50 je řeč o prasečích fétech v třetím trimestru gestace– je míněna patrně třetí třetina gestace.

Otázky:

- Ke str. 51: je prokazováno, že velké množství mononukleárních buněk kostní dřeni jsou buňky linie B. Je představa o tom, jak velkou proporcí představují ve fetální kostní dřeni buňky monocytární linie ?
- Je možné v prasečí kostní dřeni identifikovat prekursorů lymfocytů T, které posléze odchází k další diferenciaci do thymu?
- Prosím o vysvětlení této diskrepance: na straně 54 se uvádí: „...jsme nikdy nedetekovali současnou expresi sIgM a SWC 3 ...“ a u obrázku 11 na str. 56: „...CD2/SWC3 pozitivní

buňky se rozpadly na dvě populace jak podle exprese IgM (E) tak podle velikosti (F).“ Může tedy být povrchové IgM exprimováno současně s SWC3 nebo ne?

**Závěr:**

Práce přináší několik významných původních výsledků a ukazuje na značné experimentální zkušenosti, teoretický přehled autorky a schopnost interpretace výsledků. Je důkazem schopnosti samostatné vědecké práce a doporučuji její přijetí jako podkladu pro udělení vědecké hodnosti PhD.



Doc. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc.

Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK

V Praze dne 15. 2. 2006