

VĚC: Posudek disertační práce**Student: Mgr.Bc.Ivan Leontovyč****Název práce: „Diferenciace pankreatických kmenových buněk na β -buňky produkující inzulín“**

OR: Biologie a patologie buňky; školitel: Prof.MUDr. František Saudek, DrSc.

Vážený pane profesore,

se zájmem jsem přijala oponenturu výše specifikované disertační práce. Její jednotlivé aspekty hodnotím takto:

Aktuálnost řešeného tématu

Téma je vysoce aktuální. Pacientů s diabetem 1. i 2. typu přibývá. U pacientů s diabetem 1. typu je inzulínopenie zapříčiněná destrukcí β -buněk pankreatu autoimunitním zánětem základním patogenetickým mechanismem vedoucím k hyperglykémii. Nicméně i u pacientů s diabetem 2. typu dochází ve finálních stádiích choroby k významnému poklesu inzulínové sekreční kapacity.

V současné době jsme svědky rozvoje technického řešení problému, kdy již existuje v některých zemích komerčně dostupná inzulínová pumpa schopná samostatné (autonomní) volby bazální dávky inzulínu dle vývoje koncentrace glukózy v intersticiu sledované speciálním a s inzulínovou pumpou bezdrátově propojeným glukózovým senzorem. Nicméně určité, nevýznamné, problémy zůstávají: pacient musí sám rozhodnout o velikosti prandiální dávky inzulínu, s touto léčbou je spojena nutnost neustálého nošení přístroje, z kterého plyne určité nepohodlí, je nutné zavedení a pravidelná výměna podkožní kanyly infuzního setu, totéž platí pro aplikaci glukózového senzoru, existuje možnost selhání techniky či uživatele atd.

„Biologický přístup“ by s těmito problémy spojen nebyl. Jsou zde ale dva základní problémy. Regenerační kapacita β -buněk je velmi limitovaná, a tak prvním problémem je najít vhodný buněčný zdroj schopný operativní produkce inzulínu. Při arteficiálních buněčných manipulacích majících za cíl navodit schopnost sekrece inzulínu je hlavním nebezpečím možnost vzniku nádorového bujení.

Použité metody a postup

Hlavním cílem práce bylo vytvoření, resp. optimalizace laboratorního protokolu pro diferenciaci exokrinních buněk pankreatu (jednalo se o komerčně dostupnou linii potkaních buněk) na buňky schopné produkce inzulínu. Transdiferenciace těchto buněk bylo docíleno pomocí 3 klíčových transkripčních faktorů dodaných ve formě syntetické mRNA. Efekt postupu byl ověřován na úrovni genové exprese, produkce proteinu (imunofluorescenčním barvením) i na úrovni vlastního biologického účinku. Jedná se **náročné laboratorní postupy, navíc účinně zkombinované. Stručně jsou popsány i použité statistické metody, byť v tomto ohledu mohla být práce podrobnější.**

Výsledky (nové vědecké poznatky)

Práce prezentuje vytvoření nového slibného metodického postupu, byť nebylo dosaženo zcela ideálního výsledku. Vysoce kladně hodnotím nápad na snížení úrovně apoptózy (přidáním inhibitoru interferonu B18R), a nápad navodit snazší transkripci díky zavedení přídatné epigenetické manipulace (tj. navození inhibice aktivity DNA metyltransferázy).

Disertační práce obsahuje celkem 5 impaktovaných publikací vztahujících se přímo k jejímu tématu, ve dvou případech je Mgr. Lentovyč prvním autorem. To dokládá, že je student výsledky i náležitým způsobem prezentovat na mezinárodním odborném fóru.

Formální zpracování disertace

Práce je členěna do 12 kapitol a je napsána standardním způsobem. Po jazykové a formální úrovni považují úroveň práce za **vyhovující**.

Význam práce pro další rozvoj vědního oboru, možnosti aplikace výsledků v praxi

Vidím zde velký potenciál, i když samozřejmě od postupu na zvířecích buňkách k event. použití u člověka je ještě dlouhá cesta. Autor se v práci zamýšlí i nad dalším vylepšením zvoleného postupu, což hodnotím vysoce kladně.

Závěr posudku:

Disertační práce zcela jistě prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“, které jednoznačně doporučuji.

Otázka 1.

V teoretickém úvodu je zmíněna literární zkušenost s transdiferenciací dospělých kožních buněk na indukované pluripotentní kmenové buňky. Z hlediska rizika vzniku nádorového bujení je zmíněno, že je bezpečnější transdiferenciovat zdrojové buňky na jiný typ plně diferencovaných buněk. Jsou v tomto ohledu kromě pankreatických β -buněk nějaké zkušenosti?

Otázka 2.

Je jasné, že cílová je stabilita funkce, pro kterou byla transdiferenciace buněk provedena. Existují ale nějaké zkušenosti, zda je například přežití či imunogenicita takto získaných buněk stejná jako buněk „vzorových“? Je z tohoto pohledu rozdíl ve způsobu provedení transdiferenciace (např. vnesení proteinu vs mRNA)?

Otázka 3.

Jsou všechny eventuální zdroje buněk pro transdiferenciaci z hlediska její úspěšnosti rovnocenné (míněno při jednom konkrétním způsobu navození transdiferenciace)? Co považujete za nejrealističtější buněčný zdroj pro tento typ buněčné terapie u člověka?

Prof.MUDr.Kateřina Štechová, Ph.D.

Interní klinika UK 2.LF a FN v Motole
V Úvalu 84
15006 Praha 5 Motol
Tlf. + 420 224 434 001, 602 194 803
Email: katerina.stechova@fnmotol.cz