

Oponentský posudek

disertační práce MUDr. Magdalény Netukové

Cesta rozpoznání antigenu a imunitní odpověď po ortotopické transplantaci rohovky na myším modelu

Předložená disertační práce má 88 stran, obsahuje 23 obrázků, 88 citací domácí a zahraniční literatury především z posledních let, je doplněna 2 kopiemi prací autorky v prestižních časopisech. Práce je čistě napsána dobrou češtinou a s potěšením jsem si ji prostudoval.

Zvolené téma je vysoce aktuální. Zákaly rohovky jsou druhou nejčastější příčinou slepoty v celosvětovém měřítku. Jak autorka konstatuje v úvodu, je transplantace rohovky nejstarší a nejúspěšnější transplantací tkání, nicméně dosud nejsou jasné děje, které přijetí či odmítnutí transplantátu provázejí. S hlubokou znalostí objasňuje anatomii rohovky, imunologické mechanismy podílející se na tzv. imunologickém privilegiu rohovky, ale i na její rejekci. V rámci literární přípravy ji zaujal rozpor v názorech na úlohu subpopulací leukocytů a makrofágů v normální rohovce. Také není jasná dynamika tvorby a vstřebávání fibrinové sítě v přední komoře oka po transplantaci rohovky na myším modelu, neboť tato síťka může sloužit jako matrix pro pohyb buněk. Na prozkoumání těchto dvou základních problémů zaměřila cíle své disertační práce.

Metodická část práce byla velmi náročná. Použila čtyři druhy experimentálních myší, což dovolilo po transplantaci rohovky jednoznačně identifikovat buňky příjemce infiltrující dárcovský štěp. Tkáně byly studovány pomocí konfokální mikroskopie, v řezech, byly zhotoveny suspenze buněk. K imunohistochemickému barvení a průtokové cytometrii byla použita řada protilátek.

Výsledková část je obsažná. Bylo prokázáno rozdílné rozložení occludinu a claudinu-1 v různých vrstvách epitelu a endotelu. Pomocí konfokální mikroskopie byly prozkoumány a kvantifikovány leukocyty přítomné v rohovkovém epitelu. Podrobně bylo studováno stroma rohovky a zjištěno, že je podstatně buněčnější než se dosud soudilo, keratocyty jsou velké buňky, které spolu živě komunikují. V rohovce byla prokázána populace leukocytů CD 45+ a CD34+, pocházejících z kostní dřeně, složená ze dvou odlišných subpopulací. Obdobně, pomocí protilátek a markerů, byly studovány i další populace buněk v rohovce, speciálně buňky dendritické. Výsledky imunohistochemických barvení byly opakovaně potvrzeny

průtokovou cytometrií. Studie na DFP chimérách kostní dřeně také prokázaly jasnou subpopulaci buněk pocházejících z kostní dřeně.

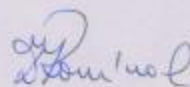
Příprava rohovky ke konfokální mikroskopii a imunohistochemické barvení umožnily kvantifikovat množství fibrinu v přední komoře oka po transplantaci a analýzu buněk působících destrukci endotelu, včetně původu leukocytů účastnících se rejekce. Navíc byl zkoumán rozdíl v neadaptivní odpovědi u syngenní a alogenní skupiny transplantovaných myši. Statistická analýza prokázala významný rozdíl u těchto skupin, to je zcela nový poznatek. Precizně je dokumentována buněčná infiltrace fibrinové sítě po transplantaci.

V diskuzi autorka fundovaně a kriticky porovnává své výsledky se světovou literaturou.

Nález speciálních proteinů odhaluje bariérový význam suprabazální vrstvy epitelu rohovky. Endotel hraje zásadní roli v udržení integrity rohovky. Významným přínosem je použití konfokální mikroskopie, které pomohlo změnit pohled na celularitu rohovky. Bylo prokázáno, že CD34+ buňky pocházejí z kostní dřeně a zjištěny minimálně dvě sub populace CD45+ buněk. Společně představují hlavní podskupinu leukocytů rohovkového stromatu. Poprvé byly popsány zvláštní typy rohovkových leukocytů – hemopoetické zárodečné buňky.

K práci nemám žádné připomínky.

Závěr: předložená disertační práce je na vysoké mezinárodní úrovni, přinesla nové poznatky, její výsledky byly publikovány v prestižních časopisech a již byly opakovaně citovány ve světové literatuře. MUDr. Magdalena Netuková splnila cíle, které si vytýčila, prokázala, že je schopná náročné vědecké práce s komplexními výzkumnými technikami a proto jednoznačně doporučuji práci k obhajobě a udělení titulu PhD.



Prof. MUDr. Pavel Rozsival, CSc.
Oční klinika FN
Hradec Králové