

Posudek oponenta diplomové práce na téma
“Úloha morfogenů v průběhu diferenciaci neurálních kmenových buněk”
vypracované Bc. Pavlem Honsou

Předložená diplomová práce byla vypracována v oddělení buněčné neurofyziologie Ústavu experimentální medicíny, v.v.i., pod vedením Ing. Miroslavy Anděrové, CSc. V úvodní části spisu, jenž má celkem 70 stran včetně seznamu literatury, jsou obsaženy základní údaje o obecných poznatcích týkajících se rozdělení a definice základních podtypů kmenových buněk, hlavní informace o jejich distribuci a potenciálních možnostech využití v regenerativní medicíně. Cíle práce jsou přehledně formulovány ve třech hlavních bodech zahrnujících studium vlivu morfogenů na 1) elektrofyzilogické, 2) imunocytochemické a 3) expresní vlastnosti neurálních kmenových buněk v průběhu diferenciaci. Výsledky experimentální práce (12 stran) předchází stručný popis metodických přístupů (5 stran). V diskusi výsledků práce (4 strany) se autor soustředí na stručné shrnutí výsledků a objasnění souvislostí dané problematiky v kontextu současných světových poznatků.

Poškození nervového systému představuje jeden z obtížných a dosud nezvládnutých klinických problémů. Zvolené téma diplomové práce je proto nadmíru aktuální a závažné. Předložená práce přináší řadu nových poznatků, z nichž za nejvýznamnější považuji zjištění prokazující zásadní vliv morfogenů Shh a Wnt7a na tři funkčně a morfologicky definované kategorie neurálních kmenových buněk. Autor experimentálně potvrzuje oprávněnost tohoto dělení kmenových buněk na základě studia exprese specifických neuronálních a gliálních markerů a pomocí srovnávací elektrofyzilogické charakteristiky. Autor poukazuje na možnou významnou úlohu Wnt-7a v buněčné diferenciaci a dochází k závěru, že tento morfogen může zvyšovat počet buněk, jež se svými elektrofyzilogickými vlastnostmi více podobají neuronům (tj. vykazují přítomnost napětově aktivovaných Na^+ iontových kanálů).

Objem experimentálních výsledků je úctyhodný a vypovídá o houževnatosti a odborném zaujetí diplomanta. V tomto ohledu je cenné, že řešená problematika zahrnuje různé aspekty možných mechanismů vlivu morfogenů a zejména různé přístupy k hledání funkčních a morfologických rozdílů mezi kmenovými buňkami. Autor používal metodicky náročné techniky, které jsou na pracovišti dobře zavedené a zaručují tak spolehlivost získaných dat: technika „patch-clamp“, technika pěstování a množení kmenových buněk v podmínkách tkáňových kultur, imunohistochemické techniky, stanovení exprese proteinů Western-blot.

Hodnocení formální úrovně diplomové práce:

Práce je psána pečlivě, přehledně, s jasně formulovanými myšlenkami. Až na několik drobných gramatických přehlédnutí nemám k formální ani jazykové úpravě žádné připomínky (např. str. 63-70 nekonzistentní formát seznamu citované literatury, různé označení obrázků a grafů v textu střídavě malými nebo velkými písmeny, často s tečkou označující řadovou číslovku, str. 16 dole „expresi“, str. 27, 7. ř. 2. odst.zdola „proudové hustotě“, str. 45 vlevo „dithiothreitol“, str.45, předposlední řádek „třemi symboly“).

Velmi oceňuji, že se autorovi i přes rozsah a obtížnost studované problematiky podařilo vybrat podstatné souvislosti. Za promyšlené a zodpovědné rovněž považuji, že v diskusi se autor nepouští do přebytečných spekulací a omezuje se na bezprostřední interpretaci svých výsledků.

Námět pro rozpravu:

1. Proč byly vybrány pro podrobnou analýzu právě morfogeny Shh a Wnt7a?
2. Pozoroval autor nějaké náznaky korelace mezi intenzitou GFP a charakteristikou elektrických odpovědí (tj. byly více exprimující buňky snadněji zařaditelné k danému podtypu)?
3. Neměla by být exprese neuronálních markerů a vliv morfogenů správněji porovnávány statistickou metodou analýzy variance? Zejména v případě výsledků uvedených na str. 49-50, kde autor porovnává skupiny obsahující 41 vs. 4 buňky, nebo 18 vs. 2 v grafu 13.
4. Na str. 44 autor uvádí, že pro kvantifikaci imunocytochemických výsledků bylo použito vždy pět obrázků z minimálně 3 skl. V sloupcových grafech 14-26 není

přesto zřejmé, jak byla data analyzována a z jakého počtu buněk. Mohl by autor vysvětlit postup analýzy?

5. Na str. 20-28 autor popisuje základní elektrofyziologické charakteristiky buněk nervového systému. Mohl by se autor pokusit odhadnout, jaký mohou mít vliv na proudovou charakteristiku samy o sobě morfologické vlastnosti buněk? Používal autor některou z technik elektrické kompenzace?
6. Autor uvádí na str. 27, že charakteristickým rysem oligodendrocytů jsou „...pasivní klesající K^+ proudy v průběhu depolarizace a hyperpolarizace a hlavně *propustnost* membrány pro draslíkové ionty po ukončení změn membránového potenciálu..“. Jaká je představa autora o mechanismu vzniku těchto „tail“ proudů?

Jsem přesvědčena, že autor se při obhajobě vypořádá s drobnými připomínkami uvedenými v tomto posudku, a proto mohu v souhrnu konstatovat, že **předložená práce Bc. Pavla Honsy prokazuje zvládnutí náročné tematiky a splňuje jak formální, tak obsahové náležitosti diplomové práce. Proto doporučuji magisterskou diplomovou práci k obhajobě.**

V Praze, 26. května 2008



RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Fyziologický ústav AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4 - Krč