

OPONENTSKÝ POSUDEK

disertační práce Mgr. Ivy PRAJEROVÉ

„Membránové vlastnosti neurálních kmenových/progenitorových buněk v průběhu *in vitro* diferenciace a po transplantaci do mozku potkana“

UK-Praha, 2. LF

Formální stránka spisu:

Disertační práce je tvořena 150 stranami vlastního textu, do něhož je vložena obrazová dokumentace, a 24 stranami literárních odkazů.

Práce je členěna dle obvyklého schématu na úvod, cíle práce, materiál a metodiku, výsledky, diskusi a závěry; na začátek spisu je předřazeno poděkování, obsah a seznam použitých zkratek; před bibliografií je zařazen seznam publikací autorky (rozdělený na práce týkající se bezprostředně tématu disertace a ostatní publikace, včetně přesného definování podílu autorky na jednotlivých experimentech); na konci disertace jsou připojeny kopie 3 základních publikací *in extenso*.

Práce je psána velmi kvalitní angličtinou, přehledně uspořádaná, doplněná velmi kvalitními mikrofotografiemi, grafy a další dokumentací.

Odborná stránka spisu:

Práce se týká velmi recentního problému neurální transplantace do mozku (v tomto případě do mozkové kůry) dospělých jedinců. Zabývá otázkou mechanismů diferenciace neurálních kmenových/progenitorových buněk (NK/NPB) *in vitro* a schopnosti těchto buněk přežívat a diferencovat se po transplantaci do nepoškozené (intaktní) kůry mozku a kůry poškozené fotochemickou lézí, tedy *in vivo*.

K řešení uvedené problematiky použila autorka celou škálu metodik: kultivace 3 buněčných linií (vč. virové transdukce), fotochemická léze kortextu (simulující těžké lokální ischemické poškození) s následnou transplantací nakultivovaných buněk (resp. transplantace buněk do intaktního kortextu), imunofluorescenční detekce (na buněčných kulturách i histologických řezech), kvantitativní imunocytochemická analýza, Western-blotová analýza – obojí včetně statistického vyhodnocení, a elektrofyziologické hodnocení (patch-clamp metoda měření Na^+ a K^+ napěťově závislých iontových kanálů) s použitím mozkových řezů.

Předložená práce vykazuje skutečně velmi vysokou úroveň jak ve způsobu zpracování zvoleného tématu, tak v hodnocení nálezů a formulování závěrů. Díky kombinaci různých, vzájemně se doplňujících metod zpracování a hodnocení materiálu (tj. kombinace *in vitro* a *in vivo* experimentů a hodnocení nálezů z hlediska morfologického i funkčního, včetně kvantitativního vyhodnocení) jsou získané výsledky validní a velmi hodnotné. Rozsah a adekvátnost literárního přehledu svědčí o tom, že autorka přistupovala k práci velmi dobře obeznámena s celou šíří řešené problematiky. Stejně tak i přehledně a exaktně zpracovaná diskuse a z ní vyplývající závěry převyšují svým nadhledem standardní úroveň disertačních prací. Některé nálezy jsou zcela původní (např. charakteristika diferenciálního potenciálu transplantovaných buněk neuroepitelové buněčné linie GFP/NE-C4 v porovnání s linií embryonálních NK/NPB D6-GFP - s morfologickou charakteristikou korelují i elektrofyziologická měření; porovnání vlivu morfogenů Sonic hedgehog a Wnt-7a na proliferaci a diferenciaci buněk neurosfér aj.), další doplňují/rozšiřují stávající poznatky.

Vysokou kvalitu předkládané práce dokládá i to, že většina výsledků byla již publikována v časopisech s IF (průměr IF=3.029); ze 2 publikovaných prací a 1 jedné odeslané do tisku, které se bezprostředně týkají tématu disertace, je předkladatelka první autorkou u 2 z nich; dále je spoluautorkou 3 prací (rovněž v časopisech s IF) s příbuznou tématikou. Publikační aktivita autorky rovněž výrazně převyšuje běžný standard.

Připomínky:

Poznámky k terminologii – nejsou podstatné

Název kapitoly 2.2. (str. 21) „Physiology of adult neurogenesis“ neodpovídá obsahu, protože se věnuje především morfologickým nálezům – spíše jen „Adult neurogenesis“.

Endogenní neurogeneze (str. 30) zahrnuje prenatální (embryonální/fetální), neonatální a adultní neurogenezi – zde se jedná pouze o adultní typ.

Poznámky/připomínky k nálezům a výsledkům:

U jednotlivých kapitol, týkajících se morfologických nálezů, bych doporučovala podrobnější popis nálezů, které lze dobře vyčíst i z fotodokumentace; rovněž je vhodné i zde uvádět závěry, vyplývající z nálezů – uvádíte je většinou až v diskusi, kde se někdy ztrácejí v řadě citovaných prací, se kterými je zde (zcela správně) porovnáváte. U elektrofyziologických nálezů je popis dostatečně obsáhlý.

Také postrádám podrobnější komentář např. k zajímavým novým výsledkům dokumentovaným grafy na str. 111 – výrazný rozdíl v exprese β -III-tubulinu a MAP2, výrazné zvýšení density exprese MAP2 v přepočtu plochy na 1 buňku u skupiny Wnt-7a, které dokládá, že tento morfogen ovlivňuje maturaci neuronů, což jasně vidět i na obr. 41 a 43.

(str. 130) Jestliže buňka exprimuje β -III-tubulin (tedy obsahuje neurofilamenta), nemůžete ji označit za progenitorovou – jedná se o neurální prekurzor čili neuroblast (ty se obvykle ještě opakovaně dělí, než dojde k terminální diferenciaci v neurony)

- interval diferenciace 3-8 dní nelze označit jako celé (entire) období diferenciace, je to pouze (poměrně krátký) časový interval, který jste sledovali.

(str. 99+141) Výsledkem fotochemické léze je lokální nekróza nervové tkáně (kortexu), která je postupně ohrazena gliovou jizzou (reaktivní astrocyty – obr. 19); odumřelá tkáně je (poměrně rychle) odklizena fagocyty a výsledkem je pseudocysta/kavita v kortexu. Proto nemůžete vůbec uvažovat o možnosti, že by zde mohly být přítomny nějaké endogenní buňky gliové a tím spíše nervové; stejně tak nelze uvažovat o tom, že by do této kavity vcestovali nějaké neuronální buňky z tkání hostitele, protože je vyloučeno, že by mohly proniknout přes gliovou jizzu – její neprostupnost dokládají např. β -III-tubulin+ nervová vlákna, která se paralelně vrství na zevním okraji gliové jizvy, protože přes ni nemohou prorůst – obr 15. Uvedená fakta tedy jasně potvrzují, že neuronální buňky, nalezené v transplantátu, pocházejí výlučně z transplantovaných buněk.

Stejně tak nemůžete v adultním mozku všechny GFAP+ buňky považovat za NK/PB (jsou pouze v SEZ a SGZ) – zde se jedná pouze o reaktivní astrocyty - je tedy opět neadekvátní předpokládat, by se z nich případně mohly diferencovat neurony nebo oligodendrocyty („Although it was shown that injury promotes proliferation of GFAP+ astrocytes in cortex, these cells do not produce neurons or oligodendrocytes“).

(str. 150 - Závěry) ad 1. – zmíněné buňky se diferencují především, ale ne výlučně v nervové buňky (viz obr. 25); ad 5. – také Shh zlepšuje maturaci nervových buněk (růst výběžků), ale podstatně méně než Wnt-7a (viz obr. 41)

Dotazy (v širším kontextu):

- 1) V diskusi na str. 131 a 140 správně uvádíte rozdíly mezi diferenciací buněk z linie GFP/NE-4C a D6-GFP NS/PCs – co je hlavním důvodem Vámi uváděné homogeneity, resp. heterogeneity buněčné populace diferencující se z uvedených buněčných linií?
- 2) Domníváte se, že výsledky získané z neurálních transplantací u neonatálních zvířat jsou shodné s výsledky u zvířat dospělých?
- 3) Co považujete za hlavní důvod (důvody) omezení interpretace/aplikace výsledků získaných z experimentů *in vitro* do poměru v živém organismu (*in vivo*) – nebo jsou výsledky, získané těmito 2 typy experimentů, zcela srovnatelné?

ZÁVĚRY

Disertační práce, stejně jako publikační aktivita Mgr. I. Prajerové, svojí kvalitou zcela jednoznačně prokazuje předpoklady autorky k samostatné vědecké práci.

Doporučuji proto udělit Mgr. Ivě Prajerové titul "Ph.D."

Doc. MUDr. Yvona Mazurová, CSc.