

Posudek doktorské disertační práce

Disertant: **MUDr. Petra Obrtlíková**

Název práce: **Differentiation of human embryonic stem cells into endothelial and smooth muscle cells as a model for vascular development**

Mechanismy řídící diferenciaci buněk jsou po dlouhá léta v centru zájmu vývojové a buněčné biologie. Jejich poznání je v současné době v nevídané míře využíváno při vývoji strategií pro *in vitro* diferenciaci kmenových buněk do funkčních buněčných typů dospělého organismu. Předložená disertace a v ní obsažené experimenty velmi dobře spadají do tohoto moderního vědeckého směru a přináší tak vědecky a zejména biomedicínsky velmi atraktivní poznatky.

Ze spektra kmenových buněk, které nám současnost nabízí, vybrala disertantka ke své experimentální práci kmenové buňky odvozené z preimplantačních zárodků člověka – takzvané lidské embryonální kmenové buňky (hES buňky). Ve vzorně organizované úvodní teoretické části disertační práce její autorka nejprve v kondenzované formě popisuje základní charakteristiky hES buněk a jejich očekávané medicínské užití. Drtivá většina úvodní části je však vhodně věnována vývojově-biologickým aspektům vaskulogeneze a následné angiogeneze a zasazuje tyto poznatky do kontextu možné rekapitulace těchto procesů *in vitro* s embryonálními kmenovými buňkami stojícími na začátku tohoto procesu. Z této části jsou pak dále vyvozeny odpovídající globální a specifické vědecké cíle disertace, které jsou jednoznačně definovány a osvětleny.

Disertační práce je velmi bohatá technikami, které autorka musela pro zdárné experimentování zvládnout. Zahrnují kultivaci buněk, jejich flowcytometrickou analýzu,

spektrum imunochemických technik, kvantifikaci mRNA, transmisní elektronovou mikroskopií, a další. Kapitola, která tyto techniky popisuje je obdobně jako úvodní část disertační práce velmi kondenzovaná. V tomto případě však tuto skutečnost nepovažuji za velké pozitivum. Dal bych přednost přinejmenším jinému/přehlednějšímu uspořádání, než jaké je typické pro vědecké publikace (například imunoreagens seřazená v tabulkách, komplexnější roztoky v samostatných odstavcích etc.).

Část disertační práce, která sumarizuje a diskutuje výsledky experimentální práce má rozsah 16 stran a je doplněna obrázky a schémata s dostatečnou výpovědní hodnotou. Svým členěním i obsažností tak tato část plně odpovídá požadavkům na práci tohoto typu. Klíčovým výsledkem vzešlým z experimentů je dosažení *in vitro* diferenciaci hES buněk do vaskulárních progenitorových buněk schopných další diferenciaci do obou buněčných typů podílejících se na stavbě cév – endotelií a hladkosvalových buněk. Tento proces je výrazně potencován aktivitou signálních molekul Wnt-1 a Wnt-5. Tyto výsledky jsou obsahem práce publikované v časopisu *Experimental Hematology*, která je evidentně klíčovou prací disertantky a je přiložena v disertační práci v plném rozsahu. Součástí disertace jsou také další tři publikace, z nichž dvě se vztahují k původnímu tématu disertační práce a jejich obsah a vztah k tématu je dostatečně osvětlen v kapitole 9.3. disertace.

Celkově představuje předložená disertační práce z pohledu obsaženého experimentování a jím dosažených výsledků velmi kvalitní dílo. Práce stojí na použití širokého spektra technik vývojové, buněčné a molekulární biologie včetně sofistikovaných zobrazovacích metod a funkčních testů. Práce adresuje velmi významné biologické fenomény a výsledky v ní obsažené výrazně posouvají naše poznání v dané oblasti. Nezanedbatelný je impakt práce z pohledu možného využití v klinické medicíně. Všechny tyto skutečnosti vybízejí k pochvale nejen samotné disertantky, ale také jejího školitele a celého pracoviště (v ČR i USA).

K disertační práci mám pouze několik poznámek a dotazů do diskuze:

- Jak je uvedeno na práci v časopisu *Exp. Hematol.*, první dva autoři (Hill a Obrtlíková) přispěli k jejímu vzniku stejným dílem. Přesto by bylo vhodné přesně specifikovat, které experimenty byly realizovány disertantkou.
- V práci bylo ukázáno, že molekuly z rodiny Wnt potencují požadovanou diferenciaci hES buněk pokud jsou nadprodukovány do kultivačního prostředí podpůrnými buňkami. Vykazují stejný efekt tyto molekuly i pokud jsou přidány do kultivačního média v podobě rekombinantních produktů?
- Velmi atraktivním obecným požadavkem na progenitory definitivních linií je dlouhodobá propagovatelnost/expandovatelnost *in vitro* bez ztráty jejich diferenciacního potenciálu. Zajímá

mne, zda tento parametr byl prověřen u progenitorů získaných disertantkou a pokud ano, tak s jakým výsledkem.

- Pokusili se autoři aplikovat vyvinutý diferenační protokol také na lidské iPSC?

Celkově hodnotím předloženou disertační jako vysoce kvalitní dílo, které lze bez jakýchkoli výhrad doporučit k obhajobě. Současně navrhuji, aby byl disertantce na základě úspěšné obhajoby udělen akademický titul Ph.D.

V Brně dne 18. září, 2010

Doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.

