

**Oponentský posudek disertační práce MUDr. Petry Obrtlíkové
„Differentiation of human embryonic stem cells into endothelial and
smooth muscle cells as a model for vascular development“**

Disertační práci MUDr. Petry Obrtlíkové tvoří 66 stran textu včetně 15 obrázků, 2 tabulek a 4 publikace v příloze. Vlastní výsledky jsou zevrubně popsány v příslušných úsecích disertační práce. Práce má obvyklé členění, text podává přehled o současném stavu řešené problematiky, vymezuje cíle disertační práce, materiál a metodiku, získané výsledky; disertace je doplněna diskusí a zakončena shrnutím závěrů. Text je doplněn 145 citacemi, z nichž 54 pochází z období posledních pěti let. Práci doplňuje seznam vlastních publikací a přednášek.

Po obsahové stránce je práce zaměřena na charakteristiku vaskulárních buněk odvozených z lidských ES buněk a na funkční charakteristiku získaných buněk.

V úvodu autorka poskytuje informace o pluripotentních lidských embryonálních kmenových (ES) buňkách a popisuje různé postupy produkce endotelových buněk z tohoto zdroje. V souvislosti s angiogenním potenciálem ES buněk je zmíněna nejen problematika hemangioblastu, produkce myocytů hladké svaloviny, ale též hlavní mechanismy vedoucí k formování krevního řečiště jako je vaskulogeneze a angiogeneze. Úvod je zakončen přehledem dokladujícím možné terapeutické využití vaskulárních progenitorů.

Část „materiál a metody“ čítá celkem 6 stran textu a zahrnuje řadu rozmanitých postupů, které byly použity při řešení výsledků disertační práce: kultivaci ES buněk linie H9 a jejich kkokultivace se stromálními buňkami, diferenciační eseje, průtokovou cytometrii, imunohistochemii, dále charakteristiku markerů použitých pro fenotypizaci buněk, transmisní elektronovou mikroskopii, RT-PCR. Charakteristiku buněk doplňuje měření nitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} kalcia při testování odpovědi buněk na vybrané farmakologické agonisty.

Výsledky vlastní disertační práce jsou shrnuty do čtyř kapitol, z nichž každá detailně charakterizuje vaskulární elementy odvozené od lidských ES buněk. První kapitola podává charakteristiku endotelových buněk získaných z ES buněk, a to nejen morfologickým vyšetřením ve fázovém kontrastu a TEM, ale též dokladem exprese markerů specifických pro endotel, a to pomocí imunofluorescence, lektinové cytochemie, průtokové cytometrie i RT-PCR. Kvantitativní RT PCR dokládá, že exprese markerů CD31, Tie2, eNOS a VE cadherinu těchto buněk dosahuje mnohonásobně nižších hodnot než diferencované endotelové buňky HUVEC. Funkční testy včetně 3D kultivace v Matrigelu podaly nezvratný důkaz o schopnosti těchto buněk formovat trubicovité struktury s charakteristikou primitivních kapilár.

Druhá kapitola obdobným způsobem sledovala charakteristiku buněk hladké svaloviny odvozených z ES buněk. Kvantitativní RT PCR přesně doložilo expresi transkriptů specifických pro hladkosvalové buňky. Srovnání hodnot s endotelovými buňkami odvozenými z ES buněk potvrdilo, že přepis genů specifických pro myocyty zůstává u endotelových buněk na nízkých hodnotách a stejně tak je tomu u buněk HUVEC exponovaných stejnému kultivačnímu mediu použitému pro získání myocytů. Třetí kapitola potom sledovala vliv geneticky modifikovaných stromálních buněk exprimujících nadměrná množství morfogenů Wnt1 nebo Wnt5 na množství získaných CD34⁺ progenitorů. Studie prokázala silný stimulační efekt Wnt1 nejen na množství získaných vaskulárních progenitorů, ale též jejich schopnost k produkci endotelových a hladkosvalových buněk.

Poslední kapitola podala důkaz o funkční charakteristice jednotlivých typů buněk včetně odlišné odpovědi jednotlivých buněčných populací na stimulaci 9 farmakologickými agonisty. Experiment s kokultivací endotelu a myocytů odvozených z ES buněk doložil schopnost obou typů buněk participovat na utváření primitivních kapilár.

V diskusi doktorandka dále rozebírá výhody sekvenční kultivace nediferencovaných buněk za účelem směrování jejich diferenciaci k linii buněk endotelových a hladkosvalových, uvádí další postupy umožňující ovlivnit směr diferenciaci buněk in vitro a rozvádí možné hypotézy vysvětlující produkci myocytů z vaskulárních progenitorů. Diskuse je zakončena úvahou o využití takto získaných buněk v regenerativní medicíně při léčbě chorob kardiovaskulárního systému.

Nejvýznamnější závěry jsou samostatně komentovány v závěrečném souhrnu; z jejich obsahu jednoznačně vyplývá, že všechny stanovené cíle disertační práce byly splněny.


Práce MUDr. P. Obrtlíkové je napsána pěknou a srozumitelnou angličtinou. Komentáře k přílohám jsou psány česky. Literární citace, které bývají zdrojem četných připomínek, jsou vypracovány vzorně a jednotně v celé práci (pouze citace č. 1 a 134 jsou nekompletní). Celá disertační práce se vyznačuje formální i věcnou kvalitou a obsahuje drobné překlepy, jejichž korekturu jsem vyznačil přímo v rukopisu. Kritickou připomínku bych měl pouze k obrazové dokumentaci, kde autorka přebírá schémata publikovaná v jiných pracích, ať již cizích autorů (v případě schémat) nebo prací svých uvedených v příloze. Uvítal bych, kdyby autorka použila vlastní schémata doplněná vlastními myšlenkami a popisem, který by výstižněji doprovázel vlastní text. V případě dokumentace vlastních nálezů je na škodu držet se malého formátu, který časopisy vyžadují z nedostatku místa. V disertační práci je naopak místa pro tyto účely dostatek a je to vhodné zejména při dokumentaci morfologických nálezů. Obrazová příloha ve velikosti snímků 2,5 cm x 3 cm (např. u obr. 7 a 15 G) neposkytuje dostatečné rozlišení.

Po obsahové stránce se předložená práce vyznačuje vysokou věcnou kvalitou. Největší předností předložené práce jsou jednak původní nálezy a postupy umožňující efektivní izolaci endotelových buněk a buněk hladké svaloviny in vitro z kultur lidských ES buněk a jednak precizní charakteristika izolovaných buněčných typů. Popsané výsledky jsou zde průkazně dokumentovány formou tabulek, grafů a mikrofotografiemi. Z pohledu přínosu pro rozvoj vědního oboru se jedná o zcela původní nálezy. Z výsledků práce jednoznačně vyplývá, že všechny stanovené cíle disertační práce byly splněny.

Dotaz na doktorandku:

- Co vede autorku k tomu, že metodu značení endotelových buněk pomocí diI Ac LDL uvádí jako metodu imunohistochemickou? (s. 30, 35, Fig. 7)

Souhrnně soudím, že MUDr. Petra Obrtlíková svou disertační prací prokázala předpoklady pro samostatnou tvořivou vědeckou práci. Doktorandka prokázala zkušenosti s kultivací buněk, imunocytochemií, průtokovou cytometrií, RT PCR a dalšími detekčními metodami. Prokázala též pečlivost a trpělivost nezbytnou pro mikroskopické a kvantitativní vyhodnocování nálezů a přípravě nálezů k publikaci. Řešená problematika je zcela původní a doplňuje nové poznatky o možnostech řízené diferenciaci při izolaci buněčných typů z kultur pluripotentních ES buněk. Schopnosti prezentovat a obhájit své výsledky doložila i svou aktivní účastí na řadě setkání odborných společností doma i v zahraničí. Souhrnně soudím, že předložená práce svým charakterem i rozsahem odpovídá požadavkům kladeným na doktorskou disertaci. Proto vřele doporučuji, aby se stala základem pro její obhajobu a aby byl MUDr. P. Obrtlíkové podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb. udělen akademický titul Ph.D.



prof. MUDr. Jaroslav Mokry, Ph.D.
Ústav histologie a embryologie
Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

V Hradci Králové, dne 12. 8. 2010