

Doktorská disertační práce

Název práce: **Možnosti a význam dlouhodobé kultivace embryonálních buněk různých živočišných druhů**

Autor: *Mgr. Zbyněk Houdek*

Disertační práce řeší problematiku dlouhodobé kultivace a diferenciaci embryonálních kmenových buněk. V práci je použit experimentální model myších embryonálních nádorových buněk (EC) P19, které jsou charakteristické schopností sebeobnovy, stejně jako další modelová buněčná line myších embryonálních kmenových buněk (ES), D3. Autor se zabývá kultivací ES a EC buněk a optimalizací jejich neurodiferenciaci. Autor práce rovněž zvládá kultivaci embryoidních tělísek (EBs) a zabýval se navíc transplantací GFP značených buněk P19 do zdravého mozečku (wt) myši a postiženého mozečku myši typu Lurcher. V těchto experimentech bylo hodnoceno přežívání, morfologie a lokalizace transplantátu. Další částí práce je studium významu faktoru LIF, který představuje fundamentální faktor k udržení pluripotence myších ES buněk. V práci byl navíc studován vliv faktoru LIF, respektive mutací v genu kódujícím LIF na fertilitu žen, které se léčí na IVF klinikách. Vliv specifické mutace genu pro LIF, jejíž význam byl publikován i jinými autory, byl navíc v této práci zkoumán i z hlediska úspěšnosti léčby neplodnosti u žen. Z tohoto hlediska má práce i velký společenský význam.

Předkládaná disertační práce se jeví jako velice aktuální v daném biologickém oboru, především z hlediska jejího praktického přínosu a rovněž i z hlediska zvládnutých technik. Cenné jsou především experimenty objasňující funkci faktoru LIF, který je klíčový pro nidaci blastocyst a tak jeho absence případně nefunkční mutace zásadním způsobem ovlivňují fertilitu u žen.

V úvodu je podrobně uvedena teoretická část, týkající se pluripotence a diferenciaci myších embryonálních kmenových buněk. Z výsledků uvedených experimentů je patrné, že autor musel zvládnout řadu biologických technik, jako je kultivace buněčných linií a jejich neurální diferenciaci, studium buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu, imunofluorescenci, westernový přenos a PCR techniku.

Podle databáze PubMed je Mgr. Zbyněk Houdek autorem a spoluautorem prací uveřejněných ve čtyřech odborných časopisech, jako je například Folia Biologica, J. Cellular Biochemistry a Prague Med. Rep. Disertační práce obsahuje řadu cenných a původních poznatků. Publikační aktivita autora vyhovuje požadavkům postgraduálního studia. **Disertační práce prokazuje předpoklady autora k samostatné vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.** Práce maximálně splňuje požadavky obecně kladené na disertační práce a doporučuji ji proto k obhajobě. Po přečtení celé disertace mám k autorovi následující dotazy a připomínky do diskuse:

1. U všech imunofluorescenčních značení (např. obr. 4, 5, 30) postrádám fluorescenční značení buněčných jader (např. DAPI, TO-PRO-3). Tímto způsobem by byla celá populace buněk v kolonii lépe charakterizována. Obzvláště zásadní je to u obrázku 30, kdy z v červené fluorescenci není téměř nic poznat. Pravděpodobně i vizualizace buněk v průchozím světle by poskytla lepší představu o morfologii kolonie ES a EC buněk. Je škoda, že řada výstupů z fluorescenčního mikroskopu je nezaostřená.

2. U výsledku prezentovaného na obrázku 3, by bylo vhodné doplnit imunocytochemické značení OCT3/4 proteinu i u vydíferencovaných buněk. Pro precizní prezentaci výsledku by jasně pomohlo fluorescenční značení buněčných jader nebo ukázání morfologie buněk v průchozím světle. Autor by alespoň tento experiment mohl zopakovat a změnit tak můj celkový pohled na prezentaci jeho dat z fluorescenčního mikroskopu. Je jasné, že pokud autor nemá přístup ke kvalitnímu konfokálnímu mikroskopu, tak vylepšení analýzy obrazu je obtížné, ale i klasickým fluorescenčním mikroskopem lze provádět lepší snímání obrazu.

3. Na práci se mi zdá velice cenné studium faktoru LIF z hlediska fertility žen. Na str. 74 autor tvrdí; cituji: „Porozumění významu LIF na molekulární úrovni by mohlo sloužit k vytvoření nových směrů léčby neplodnosti, které by podpořily přežívání embrya i zvýšení počtu dosažených těhotenství“. Z tohoto důvodu by mohl autor v diskusi, při obhajobě, objasnit názory na účinky LIF faktoru při kultivaci lidských embryonálních kmenových buněk.

4. Autor práce by mohl detailně objasnit rozdíly v kultivaci myších a lidských ES buněk (např. problémy během dlouhodobé kultivace a problematiku stability genomu).

5. Do budoucna bych autorovi práce doporučila více se věnovat detailnímu popisu obrázků, v této disertační práci je legenda k obrázkům dost často velmi zjednodušená.

V Brně 2.3. 2012

Doc. RNDr. Eva BARTOVÁ, Ph.D.
Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.
Královopolská 135, 612 65 Brno
Česká Republika

doc. RNDr. Eva Bártová, Ph.D.
Laboratoř molekulární cytologie a
cytometrie,
Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i. v Brně