

OPONENTSKÝ POSUDEK

disertační práce Mgr. Pavla HONSY

„Adult neurogenesis and gliogenesis after ischemic brain injury.“

UK-Praha, 2. LF a AV ČR, ÚEM

Formální stránka spisu

Disertační práce zahrnuje 106 stran textu, do něhož je vložena obrazová dokumentace (z toho 92 stran je vlastní práce), a 17 stran literárních odkazů (celkem 167 citací).

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

Práce je psána kvalitní angličtinou, přehledně uspořádaná, doplněná velmi kvalitními mikrofotografiemi, tabulkami, grafy, schémata aj.

Odborná stránka spisu

Práce se týká recentního problému endogenní gliogeneze a neurogeneze po akutní lézi v kortexu (zde s použitím experimentálního modelu fokální cerebrální ischemie) – v porovnání s kontrolními zvířaty - se zaměřením zejména na úlohu polydendrocytů v těchto procesech.

K řešení uvedené problematiky použil autor celou škálu nejen *ex vivo*, ale také *in vitro* metodik:

- 3 geneticky upravené kmeny myši (mladá dospělá zvířata)
- navození fokální ischemie v parietálním kortexu s použitím (méně obvyklé, i když jednodušší) transfrontální okluze (termokoagulací) střední mozkové artérie (MCAo)
- tkáňové řezy, buněčné kultury a neurosféry - zpracované pro imunofluorescenční detekci (celkem použito 28 primárních protilátek)
- na frontálních řezech mozku (acute brain slices) z transgenních myši exprimujících EGFP byla v kortexu provedena imunofluorescenční detekce markerů (NG2, nestinu, Ki67, DCX a GFAP) vč. kvantitativního vyhodnocení v konfokálním mikroskopu, doplněná elektrofyziologickým měřením membránových potenciálů jednotlivých buněk (metodou patch-clamp)
- hodnocení změn v subependymové vrstvě v dorzální části postranní komory ve vztahu k reakci neurálních kmenových buněk (NKB) na uvedeném modelu - histologické řezy a buněčné kultury - hodnocení morfologické (imunofluorescenční detekce), vč. kvantitativního, a elektrofyziologické (patch-clamp měření)
- hodnocení změn v genové expresi u subpopulace gliových buněk u GFAP/EGFP transgenních myši - buňky dané subpopulace byly separovány pomocí průtokové cytometrie a analyzovány RT-qPCR - byla měřena genová exprese u 47 markerů se zaměřením na rozdíly mezi polydendrocyty a astrocyty v kortexu mozku kontrolních zvířat a v reakci na akutní ischemickou lézi.

Předložená práce vykazuje 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 *ex vivo* a *in vitro* materiálu hodnoceného z hlediska morfologického i funkčního, včetně kvantitativního vyhodnocení, doplněné (velmi přínosnou) charakteristikou změn v expresi genů gliových buněk - jsou získané výsledky validní a velmi hodnotné. Rozsah a adekvátnost literárního přehledu svědčí o tom, že autor přistupoval k práci velmi dobře obeznámen s celou širší řešené problematikou. Stejně tak je přehledně a exaktně zpracovaná diskuse a z ní vyplývající závěry. Řada nálezů (týkajících se především diferenciačního potenciálu polydendrocytů v reakci na fokální ischemické poškození kortexu) je zcela původních, 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 přiložených prací je 3.524); ze 3 publikovaných prací, vztahujících se bezprostředně k tématu disertace, je předkladatel prvním autorem u 2 z nich; dále je prvním autorem (1x), resp. spoluautorem 6 prací (rovněž v časopisech s IF) a 1 kapitoly v knize. Publikační aktivita autora rovněž výrazně převyšuje běžný standard (a dokládá výbornou spolupráci celé výzkumné skupiny).

Připomínky k disertační práci jsem v podstatě neměla; několik drobných chyb, které se týkaly terminologie a několika citací, byly v práci opraveny po interní oponentuře disertace na ÚEM.

Dotazy

- 1) Domníváte se (jak by se zdálo podle závěru na konci práce), že výsledky experimentálních prací (při studiu CNS prováděných především na myších a potkanech) lze jednoznačně přenést do klinické praxe, tj. uplatňovat při modelaci léčebných postupů u pacientů?
- 2) Lze považovat tvorbu gliové jizvy (např. v souvislosti s aktivací polydendrocytů) za regenerativní mechanismus/ proces? (uvedeno v závěrech práce)
- 3) Považujete (v práci prokázanou) neurogenezi v ischemií poškozeném kortexu za významnou (zejména z pohledu regenerativního a funkčního)?
- 4) NG2 (neuron-glia) proteoglykan exprimují v nervové tkáni i pericyty. Existuje pro tento jev nějaké vysvětlení?

ZÁVĚRY

Disertační práce i publikační aktivita Mgr. Pavla Honsy svojí kvalitou zcela jednoznačně prokazují jeho předpoklady k samostatné vědecké práci.

Doporučuji udělit Mgr. Pavlu Honsovi titul "Ph.D."

Doc. MUDr. Yvona Mazurová, CSc.

V Hradci Králové 26.3.2015