

Vyjádření k disertační práci MUDr. Tetyany Chumak - Role of Islet 1, BDNF and nanoparticles in development, function and regeneration of the auditory system.

Disertace MUDr. Tetyany Chumak shrnuje výsledky výzkumu, zaměřeného na možnosti regenerativní léčby ztráty sluchu. Předložená disertace má 137 stran textu a je doprovázena 41 obrázky (grafy, kompozice mikrofotografií, schémata). Práce je členěna do 7 kapitol, osmá kapitola obsahuje seznam použité literatury, který má více než 330 položek, devátá kapitola je seznamem autorčiných publikací.

K disertaci jsou přiloženy kopie 3 publikovaných studií.

V první úvodní kapitole jsou shrnuty základní údaje o struktuře vnitřního ucha se zaměřením na Cortiho orgán, zevní a vnitřní vláskové buňky a jejich inervaci.

Následuje popis ascendentní i descendentní (olivokochleární systém) složky sluchové dráhy, která je podrobněji popsána až do úrovně colliculus inferior. V úvodní kapitole následuje popis vývoje vnitřního ucha, úloha transkripčního faktoru Islet 1 a neurotrofního faktoru BDNF při vývoji a regeneraci struktur vnitřního ucha. Autorka podrobně uvádí regenerační postupy zaměřené na cílové struktury Cortiho orgánu, tj. vláskové buňka a neurony spirálního ganglia. Jsou popsány terapeutické přístupy k vnitřnímu uchu včetně aplikace léků pomocí nanočástic.

2. kapitola obsahuje cíle studie a hypotезy, které se autorka snažila potvrdit.

Zejména jde úlohu transkripčního faktoru ISL1 ve vývoji sluchového systému, úlohu růstového faktoru BDNF ve vývoji dolní části sluchové dráhy a možnosti využití nanočástic pro intrakochleární aplikaci substancí, které ovlivňují regeneraci smyslových buněk a neuronů vnitřního ucha.

3. kapitola je zaměřená na použité metodiky. Kapitola je velmi podrobná (20 stran) a zahrnuje řadu elektrofyziologických metodik, aplikaci nanočástic, analýzu exprese genů, a několik metod morfologické analýzy studovaného materiálu.

Ve čtvrté kapitole jsou shrnuty hlavní výsledky studie a připojených publikací. Pátá kapitola je diskuse, šestá souhrn a sedmá obsahuje závěry práce.

Autorka se zaměřila na tři okruhy problémů, jejichž studium by mohlo vést ke zlepšení funkce periferního sluchového aparátu. V první řadě je to působení transkripčního faktoru ISLET 1 a působení růstového faktoru BDNF při vývoji struktur vnitřního ucha. Další studovanou oblastí je použití nanočástic jako nosičů léčebných substancí aplikovaných do vnitřního ucha. Studované problémy zároveň naznačují orientaci léčebných postupů, které by měly vést k regeneraci vláskových buněk Cortiho orgánu a neuronů v ganglion spirale.

První z nich je studium úlohy transkripčního faktoru Islet 1 a jeho využití pro zvýšení regenerativního potenciálu vnitřního ucha. Úloha Islet 1 byla studována na transgenní myši se zvýšenou expresí tohoto transkripčního faktoru. Jeho zvýšená exprese vedla k zrychlenému růstu a větvení nervových vláken v embryonálním období. Kromě pozitivního vlivu na růst nervových vláken však dochází k postnatálnímu zhoršování sluchové funkce, které má progresi s věkem. Zhoršování funkce zevních vláskových buněk je provázeno degenerací zakončení mediálního olivokochleárního systému.

Dále byl studován vliv BDNF v nižších oddílech sluchové dráhy. U transgenních myší s delecí růstového faktoru byla prokázána snížená citlivost vláken sluchové dráhy a byla prokázána změna celé řady parametrů neuronů v colliculus inferior.. Důležitým nálezem je snížení exprese kalcium vázícího proteinu parvalbuminu (PV) ve strukturách vzestupné sluchové dráhy včetně akustického kortexu. V této části studie tak byl prokázán pozitivní vliv růstového faktoru na citlivost sluchové dráhy v behaviorálně významných frekvenčních oblastech,

Možnosti regenerativní léčby jsou do značné míry závislé na dodání účinné látky do

kochley kde je cílovou oblastí Cortiho orgán. Aplikace účinné látky musí splňovat přísná kritéria neinvazivity. V této studii byly testovány jako nosiče event. léčebných substancí tři druhy nanočástic. Autorka prokázala že všechny použité typy nanočástic (liposomy, polymerosomy a polylysin) pronikají obdobným způsobem do vnitřního ucha a vykazují obdobnou distribuci. Všechny typy nanočástic transportovaly obdobným způsobem toxickou substanci disulfiram. Uvedené nanočástice by mohly být potenciálními kandidáty pro intrakochleární neinvazivní aplikaci léčebných nebo regenerativních substancí.

Předložená disertace velmi podrobně zpracovává výsledky několikaletého výzkumu ve třech uvedených oblastech. Výsledky shrnuté v disertaci byly publikovány v renomovaných časopisech s vysokým IF. K disertaci jsou připojeny kopie 3 publikovaných studií, které jsou přímým podkladem disertace. Kromě toho je dr. Chumak spoluautorkou dalších 5 publikací s IF. Disertace je psána přehledně, je účelně členěna, pouze rozlišení na některých mikrofotografiích je slabší a celkově jsou mikrofotografie demonstrující dvojí značení příliš tmavé.

Otázky :

- a) autorka popisuje u myši s knock-out BDNF pokles density a intensity barvení PV – ir punkt v colliculus inferior a v akustické kůře. Postrádám podrobnější údaje ve kterých oblastech colliculus inferior a ve které akustické korové oblasti byla měření prováděna. Údaje pořízené z akustického kortexu by měly být doplněny údaji o laminární distribuci punkt. Je pravděpodobné, že pokles nebude stejný ve všech korových oblastech a vrstvách.
- b) z připojených publikací je zřejmé , že se na nich podíleli autoři z několika zahraničních laboratoří. Mohla by autorka podrobněji specifikovat svůj podíl a podíl ostatních domácích a zahraničních pracovníků na získaných výsledcích ?
- c) je pravděpodobné, že ze všech uvedených přístupů směřujících k regenerační

terapii ztráty sluchu má největší potenciál intrakochleární aplikace léčebných substancí. Autorka použila různé typy značených nanočástic k modelování penetrace léčebných substancí do struktur vnitřního ucha. Vzhledem k tomu, že aplikace nanočásti byla prováděna via fenestra cochlae Hamiltonovou injekční stříkačkou (s poměrně silnou jehlou), nelze vyloučit zpětný reflux značených nanočástic do středoušního prostoru a jejich následnou inkorporaci do sliznice středouší event. do okolních kostěných struktur. Může se autorka vyjádřit k možnosti takového refluxu ?

d) V disertaci je podrobně popsána intrakochleární distribuce značených nanočástic, ale postrádám objasnění mechanismu, jakým jsou značené nanočástice inkorporovány do buněčných struktur, zejména do vláskových buněk. Jde o transmembránovou difuzi nebo o jiný mechanismus ? Pronikají značené nanočástice do buněčných jader?

Předložená disertace vychází z renomované audio-laboratoře a je podložena velmi kvalitními publikacemi. Disertace a publikace, které jsou jejím podkladem jsou zaměřeny do klinicky i sociálně významné oblasti . Autorka prokázala vynikající orientaci v literatuře zaměřené na okruhy řešených problémů, velmi dobře se orientuje ve složitých metodikách a dokázala, výsledky získané mnoha metodickými přístupy interpretovat a zařadit do literárního kontextu. Autorka prokázala schopnosti k samostatné vědecké práci. Vzhledem k tomu, že autorka splnila všechny zákonné podmínky postgraduálního studia v oboru Neurovědy doporučuji, aby jí po úspěšné obhajobě disertační práce a po zodpovězení dotazů a připomínek byl udělen titul Ph.D.

V Praze 19. 8. 2016

Prof. MUDr. R. Druga, DrS

