

Oponentský posudek disertační práce

Autorka: MUDr. Anny Lenčové

Název disertační práce: "Limbal stem cell transplantation and their utilization for ocular surface reconstruction"

Předkládaná disertační práce je psaná v anglickém jazyce a obsahuje 79 stran vlastního textu a 4 příložené publikace, kde u jedné publikace je autorka uvedena jako první autor a u ostatních jako spoluautor.

Autorka ve své práci řeší významnou problematiku použití transplantace limbálních štěpů a limbálních kmenových buněk při rekonstrukci očního povrchu. V klinické praxi deficit limbálních kmenových buněk (LSCD), většinou vzniklý na základě závažného poškození očního povrchu, znemožňuje provedení úspěšné rohovkové transplantace, jelikož je postižena přirozená obnova rohovkového epitelu z oblasti limbu. Taková rohovka se nemůže správně reparovat, přerůstá spojivkovým epitelem a tím ztrácí průhlednost, což může vést až ke slepotě. Jedinou možností léčby totální LSCD je transplantace limbálního štěpu nebo limbálních kmenových buněk na poškozený oční povrch.

Ve své disertační práci si MUDr. Anna Lenčová stanovila celou řadu jasně vymezených cílů. Hlavním cílem bylo studium rekonstrukce poškozeného očního povrchu pomocí alo- a xenotransplantace limbálních štěpů nebo limbálních kmenových buněk (LSC) na myším experimentálním modelu. Dílčími cíli tohoto studia byly:

- charakterizace imunitní odpovědi na limbální implantát
- vyhodnocení efektu systémové imunosuprese při použití monoklonálních protilátek
- optimalizace izolace limbálních kmenových buněk pro následnou jejich kultivaci a přenos na oční povrch
- ověření efektu limbálních a mezenchymových kmenových buněk (MSC) přenesených na nanovláčkových nosičích na poškozený oční povrch experimentálního zvířete (myši a králíka) s následným vyhodnocením procesů hojení

Disertační práce MUDr. Anny Lenčové po formální stránce splňuje požadavky kladené na tento druh práce. Je členěná do osmi samostatných kapitol a doplněná nejen kvalitní fotodokumentací, nýbrž i velmi originálními schematickými perokresbami. V úvodní kapitole doktorandka popisuje anatomii a histologii struktur očního povrchu, vysvětluje etiologii LSCD a možné způsoby léčby tohoto onemocnění. Druhá kapitola seznamuje s cíli studia (byly uvedeny v úvodní části posudku). Zpracování dalších kapitol svědčí o systematickém přístupu k vypracování disertační práce. Kapitola "Materiály a metody" popisuje velmi podrobně všechny provedené experimenty na živých zvířatech, seznamuje s chirurgickými technikami, klinickým vyhodnocením výsledků, buněčnými izolacemi a použitými analýzami (imunohistochemie a imunocytochemie, PCR, průtoková cytometrie, ELISA). Výsledky práce popsané ve stejnojmenné kapitole odrážejí stanovené cíle, jsou řádně a detailně prodiskutovány v následující kapitole "Diskuze". Závěry jsou výstižné a jednoznačné, což svědčí o velmi dobrém přehledu doktorandky v dané problematice. Poslední kapitoly jsou věnovány citacím a příloženým publikacím.

Hlavní vědecké přínosy disertační práce:

- 1) zjištění, že v průběhu rejekce alogenních limbálních štěpů převažovala Th1 imunitní odpověď (IL-2, IFN-gama) zprostředkována CD4+ buňkami a makrofágy produkujícími NO, u xenotransplantátu významná Th1 a Th2 imunitní odpovědi (IL-2, IFN-gama, IL-4, IL-10)
- 2) průkaz pozitivního vlivu imunosuprese aplikací anti-CD4 monoklonálních protilátek na přežívání limbálních transplantátů
- 3) vývoj nové metody separace (pomocí centrifugace na Percollovém gradientu) frakce buněk s vlastnostmi blízkými k LSC (exprese markerů K12-/p63+)

4) ověření příznivého efektu nanovláknenního 3D nosiče na růst kultivovaných LSC a MSC

5) zjištění výrazného zpomalení zánětlivé reakce: a) po společném přenosu LSC a MSC na nanovláknenním nosiči na mechanicky poškozenou v rohovku myšího oka, b) po přenosu MSC na nanovláknenním nosiči na alkalicky poleptanou králičí rohovku

Závěr posudku:

Je velmi chvályhodné, že mezi očními lékaři se najdou i takoví jako MUDr. Anna Lenčová, kteří doplňkově ke klinické praxi se věnují doktorandskému studiu zaměřeném na experimentální oftalmologii, protože hlavně experimentální práce umožňuje použít úplně nové a dříve nevyzkoušené a neověřené postupy v terapii očních poranění a onemocnění. Tato disertační práce ukazuje, že experimentem získané poznatky přinášejí nové a významné znalosti z oblasti transplantační a buněčné terapie. Proto téma disertační práce považuji za vysoce aktuální, jenž řeší z klinického hlediska velmi závažnou problematiku.

Úspěšné splnění stanovených cílů autorka již prokázala v prvních třech publikacích, kde byly sledovány procesy hojení očního povrchu převážně z pohledu imunitní odpovědi na LSC transplantaci. Ve čtvrté publikaci autorka rozšířila záběr sledovaných procesů tím, že popisuje příznivý biomodulační efekt transplantovaných MSC na hojivé procesy v experimentálně poškozené rohovce navíc z hlediska potlačení oxidačního stresu, nadměrné proteolýzy a neovaskularizace.

V této souvislosti rád bych se doktorandky dotázal, zda při léčbě částečné LSCD je efektivnější a perspektivnější buněčná terapie pomocí LSC nebo MSC buněk.

Autorka předložila velice dobře zpracovanou disertační práci, která přináší originální a významné poznatky z hlediska jak základního výzkumu, tak i případného budoucího klinického využití. Rovněž kvalitu výstupu (4 publikace v kvalitních mezinárodních časopisech s IF) lze považovat za výbornou.

K výsledkům a závěrům práce nemám žádné připomínky a doporučuji, aby po úspěšné obhajobě byl MUDr. Anně Lenčové udělen vědecký titul PhD.

V Liběchově, 15. června 2015

MUDr. Taras Ardan, PhD.
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.