



Posudok na dizertačnú prácu: Mgr. Lenka Brůčková

## „Metody buněčné analýzy pro studium a charakterizaci lidských buněčných linií“

Predložená práca sa zaoberá vývojom dlhodobých kultivačných postupov pre nové kultivačne náročné bunkové línie. Ako konkrétne bunky boli vybrané ľudské granulóзовé bunky (GCs), ktoré sa nachádzajú v Graafových folikuloch vaječníkov. Samotná populácia granulózových buniek bola získaná od žien, ktoré podstupovali fertilizáciu *in vitro*. Autorka na riešenie tejto úlohy použila techniky izolácie, separácie, kultivácie, *ex vivo* expanzie, identifikácie a charakterizácie granulózových buniek ľudských ženských ovárií.

Autorke sa podarilo úplne splniť ciele, ktoré si zadala. Vedecká hodnota práce je podľa môjho názoru značná. Zavedenie nových postupov pri riešení čiastočných problémov hodnotím z hľadiska poznania a jeho zavedenia do laboratórnej praxe vysoko:

- i) Zistenie, že transport buniek po ich odobratí je potrebný pri 37°C predstavuje prelúdiu úspešného riešenia danej úlohy. Pokiaľ viem, iné pracoviská tento problém nemajú – bunky sa kultivujú po odobratí priamo „v dome“.
- ii) Použitie získanej folikulárnej tekutiny pre založenie primokultúry je čin pioniersky a veľmi elegantný. Samotná folikulárna tekutina použitá pri transporte je pravdepodobne ďalším z faktorov, ktorý je potrebný pre založenie takejto kultúry.
- iii) Množstvo titrácií pre nájdenie optimálneho spôsobu kultivácie granulózových buniek, krížové kontroly ako aj vyvodenie záverov pre ďalší postup pre mňa ako posudzovateľa vyvolalo dojem hlbokéj spletitosti, ktorej je ťažko porozumieť. Musím ale priznať, že vďaka prehľadnému spracovaniu s jednoznačnými závermi sa táto spletitosť postupne stratila a premenila sa na príjemné zistenie: Veď ja tomuto rozumiem!
- iv) Autorka zvládla aj techniky fenotypizácie buniek prietokovou cytometriou, imunocytochemické stanovenia, metódu kvantitatívnej PCR (pre stanovenie mRNA gonádotropných receptorov, dĺžky telomér) ako aj stanovenia karyotypu.

V zozname príloh je Mgr. Lenka Brůčková uvedená ako prvá autorka 3 publikácií. Prvá z nich v *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (impact faktor 1,253) z roku 2011 predstavuje určite povzbudenie v jej vedeckej dráhe.

Vzhľadom na to, že povinnosťou oponenta je klásť otázky, dovoľm si ich niekoľko položiť:

- 1) Na str. 73 je uvedená veta: „Oocyt bol odstránený spolu s tenkou vrstvou kumulárných buniek“. Moja otázka znie: Ako?
- 2) Folikulárna tekutina obsahuje glykosaminoglykany –chondroitín sulfát, dermatan sulfát, hyaluronan a heparín. Práve tieto molekuly sa podieľajú na tvorbe medzibunecnej matrix, adhézii buniek, komunikácii medzi bunkami a matrix, migráciou buniek, bunkovou proliferáciou a aktiváciou receptorov pre rastové faktory (str. 85), Nebolo by vhodné otestovať prídanie zmesi glykosaminoglykanov do média a sledovanie takéhoto prídania na potenciáciu rastu GCs po iniciácii tkanivovej kultúry pri výmene médií?

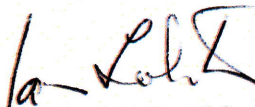


- 3) Bunky v tkanivových kultúrach boli inkubované v prítomnosti FCS, ktoré pri vyšších koncentráciách neumožňovalo/inhibovalo ich rast. Pri kultiváciách ľudských mezenchýmových buniek využívame miesto prídania FCS doštičkový/trombocytárny extrakt (PE – platelet extrakt), pripravený z izolovaných trombocytov. I keď to nebolo cieľom práce, neuvažovalo sa o otestovaní prídania PE pri kultiváciách GCs buniek?
- 4) Ako je možné vysvetliť, že prídavky IGF-1, ITS ako aj VEGF nemali na proliferáciu GCs *in vitro* významný vplyv (str. 80), hoci sa významným spôsobom *in vivo* do nej zapájajú?
- 5) Na str. 96 len drobný komentár: Amfotericín B nie je antibiotikum ale antimykotikum. V čom mohol spočívať jeho inhibičný efekt na rast GCs? Teda zvyšovanie a nie znižovanie DT ako je nesprávne uvedené.
- 6) Na str. 115, obr. 55 je uvedený pozitívny dôkaz FSH-R metódou WB pri GCs v rôznych pasážach, pri použití nádorovej línie COV 434. Musím sa priznať, že daná pozitivita pre FSH-R mi pripadá v porovnaní s pozitivitou pre iné proteíny na obr. 56 veľmi slabá až negatívna. Aké je zdôvodnenie takejto interpretácie výsledku?
- 7) Pri kultiváciách GCs od 52 pacientiek boli izolované granulózové bunky (GC8), ktoré rástli trojnásobne dlhšie a s kratšou dobou DT (str. 122). Z pohľadu klinika by som takúto pacientku odporučil dispenzarizovať a pravidelne monitorovať. Neviem samozrejme posúdiť riziko vzniku nádoru, ktorý ale patrí k terapeuticky zle ovplyvniteľným a tým prognosticky veľmi zlým druhom zhubných nádorov.
- 8) Na str. 82 v texte pod obr. 30 je: „u dvoch pacientů“, na str. 84 v tab. 9 je „pacient 1, pacient 2, pacient 3“. Domnievam sa, že vzhľadom na to, že ide o analýzu buniek z vaječníkov, správne by malo byť pacientka, resp. pacientok.
- 9) A na koniec všeobecná otázka vychádzajúca zo záveru na str. 123: Akým spôsobom by sa dali v budúcnosti využiť poznatky získané kultiváciou GCs pri liečbe príčin neplodnosti?

Záverom by som chcel dodať, že predložená práca dokladuje schopnosť autorky úspešne riešiť zložité vedecké problémy, využívať širokú škálu najmodernejších postupov a prístupov a tvorivým prístupom vyvíjať nové. Dizertantka splnila všetky vytýčené ciele. Autorka dospela k zaujímavým a vedecky hodnotným výsledkom. Jej vedecká a publikačná aktivita je v súlade s požiadavkou pre úspešné ukončenie postgraduálneho štúdia ako úspešné obhájenie dizertačnej práce spolu s udelením titulu PhD.

**Vzhľadom na vyššie uvedené odporúčam prijatie práce na obhajobu.**

V Bratislave dňa 01.06.2012



MUDr. Ján Lakota, CSc.  
Národný onkologický ústav, OKHT  
Ústav experimentálnej onkológie SAV





MASARYKOVA UNIVERZITA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA  
Komenského nám. 2, 662 43 Brno  
Tel: 549491111  
FAX: 549491320

Ústav histologie a embryologie

**Prof. Ing. Karel Vytrás, DrSc.  
Předseda komise pro obhajobu disertační práce ve  
studijním programu P1419**

### **Posudek doktorské disertační práce**

Disertant: **Mgr. Lenka Brůčková**

Název práce: **Metody buněčné analýzy pro studium a charakterizaci lidských buněčných linií**

Současná biologie a biomedicína staví na po dlouhé dekády vyvíjených postupech *in vitro* kultivace a charakterizace buněk rozsáhlého spektra živočichů, včetně člověka. Předložená disertační práce spadá do této oblasti výzkumu a zabývá se nalezením postupů pro izolaci, dlouhodobou *in vitro* propagaci a fenotypizaci granulózniých buněk lidského ovariálního folikulu ve stádiu ovulace. Jedná se bezpochyby o atraktivní téma vzhledem ke stále rostoucímu počtu párů trpících poruchami plodnosti.

Disertační práce sestává ze dvou celků – vlastního textu práce a souboru informací o publikační aktivitě disertantky zahrnujícího také kopie tří disertantkou publikovaných prací. Je k velké škodě, že textová část práce poškozuje jinak vědecky velmi kvalitní dílo. Jsem přesvědčen, že problematický obsah a celková podoba textu je důsledkem konfliktu mezi názvem a opravdovým vědeckým obsahem disertační práce. Práce v žádném případě práce nevyvíjí nové metodologie či přístupy, ty jenom přebírá a aplikuje na autorkou zvolený buněčný typ s cílem odpovědět na vědecké otázky. Z pohledu reálných vědeckých otázek tak „Teoretická část“ obsahuje veskrze nezajímavé / nevědecké údaje o existujících přístupech v buněčné biologii. V této podobě by mohla být skriptem pro bakalářský kurz, nikoli však zásadním, vědecké otázky navozujícím, elementem disertační práce. Skutečnost, že „Manuály pro různé aplikace obsahují postupy,...“ (strana 29), popis principu PCR (strana 32), popis práce s Burkerovou komůrkou (strany 33-34) a





záplava dalších informací tohoto typu ani náznakem neuvádí čtenáře do skutečně řešené vědecké problematiky. Na tuto část navazuje podobně nezajímavý popis struktury a funkce folikulu, který se svým obsahem nedostává za hranice znalostí učebnicových základů histologie a fyziologie. To nejdůležitější, současný „state-of-the-art“ v izolaci, kultivaci a chování granulózních buněk různých živočišných druhů a zejména člověka, zůstává zcela nedotčen.

Posun správným směrem přináší až část „Výsledky a diskuse“, která čtenáři předkládá, alespoň v roztržité podobě, v úvodu chybějící informace. Přečtení této části čtenáře konečně přesvědčí o rozsahu a vědeckém přínosu realizovaných experimentů. Ve světle obecné náročnosti manipulace s primárními buňkami a jejich kulturami je přínos disertantky k vývoji postupů a podmínek podporujících *in vitro* růst granulózních buněk člověka nezpochybnitelný. Jisté je, že experimentální úspěch disertantky je alespoň částečně odvislý od širokého spektra aplikovaných metodologických přístupů. Souhrnně lze říct, že práce adresuje významné biologické fenomény a výsledky v ní obsažené výrazně posouvají naše poznání v dané, medicínsky závažné, oblasti.

K práci mám ještě následující drobné komentáře a náměty k diskusi:

- V práci je opakovaně (např. strana 24) použit termín embryonální buňky, co je tímto termínem míněno?
- Jaký původ má obrázek 13 na straně 28 – není uvedeno.
- Proč jsou v českém textu vloženy obrázky s anglickým popisem (např. 5, 9, 17)?
- Od kolika dárek by byly granulózní buňky získány? Strana 53 uvádí 42 žen, strana 72 uvádí 52 žen.
- Má vepř ovária? Viz strana 72.
- Strana 80 – „Obecně ITS podporuje růst buněčných linií....“. Rostou buňky a NE buněčné linie, nutno přesně formulovat!
- Strana 82 – Kultivační plocha a hustota buněk jsou dva snadno oddělitelné parametry. Měla velikost plochy vliv na růst buněk i při jejich shodné hustotě?





MASARYKOVA UNIVERZITA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA  
Komenského nám. 2, 662 43 Brno  
Tel: 549491111  
FAX: 549491320

Ústav histologie a embryologie

- Strana 88 – „velké, roztáhlé, ....., pomalu se dělicí buňky tzn. diferencované buňky“ – Z čeho autorka odvozuje údaj o diferencovanosti? Granulózní buňky jsou ve skutku již diferencované.
- Strana 92 dole – Jaký závažný poznatek byl získán srovnáním primárních buněk a buněk použité nádorové linie?
- Strana 96 dole – „Rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly způsobeny .....“ – Existují data, která dokládají takto vyřčený kauzální vztah?
- Strana 103 dole – „Některé změny jsou způsobeny....“ – Údaje tohoto typu vyžadují relevantní citace. Má autorka takové?
- Strana 116 – Buněčné typy se mohou dramaticky lišit v expresi různých molekul, včetně těch analyzovaných zde, jakékoli odvozování nádorovosti z těchto omezených dat je tedy zcela nesprávné.
- Je možné docílit dalšího zlepšení kultivačních podmínek pro granulózní buňky. Pokud ano, tak jakým směrem je nutno se vydat?

**Celkově, díky kvalitě experimentálních dat, hodnotím předloženou disertační práci jako solidní dílo, které lze doporučit k obhajobě. Současně navrhuji, aby byl disertantce na základě úspěšné obhajoby udělen akademický titul Ph.D.**

v Brně dne 6. června, 2012

Doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.  
přednostu ústavu