

Oponentský posudek na disertační práci

Ing. Kristýna Valášková

Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Studijní program: Biomateriály a biokompozity

na téma

„Příprava rekonstituovaných tkání“

Téma disertační práce Ing. Kristýny Valáškové je multidisciplinární s přesahem do tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. 3D struktury se mohou využít pro testování nejen biologické aktivity látek *in vitro*, ale i pro pochopení dějů probíhajících v tkáních či potencionální využití v medicíně.

Práce má několik cílů: (1) příprava a základní charakterizace trojrozměrného modelu kůže připraveného z lidských dermálních fibroblastů (HDF) a z linie lidských imortalizovaných keratinocytů (HaCaT); (2) studium toxicity a adheze vybraných komenzálních a patogenních bakterií na monovrstvu keratinocytů HaCaT (2D model); (3) příprava podpůrné matrice pro tvorbu tkáňových náhrad za využití HDF a extracelulární matrix tvořené HDF; (4) využití podpůrné matrice k osídlení buňkami.

Disertační práce působí přehledně. Po úvodu následuje pečlivě zpracovaná teoretická část, která se věnuje stavbě kůže, funkci kůže keratinocytů a fibroblastů, 3D modelům kůže *in vitro*, kožnímu mikrobiomu, jeho vlivu na zdraví lidské kůže, složení a funkci extracelulární matrix a jejímu využití pro přípravu biokompatibilní matrice pro tkáňové inženýrství. Následuje experimentální část, shrnutí výsledků a stručná kapitola přínos pro vědu. V práci je 24 obrázků, 7 tabulek a je citováno 202 publikací. Následuje seznam zkratk, životopis a seznam prací, ve kterých je studentka spoluautorkou.

K splnění ambiciózních cílů musela Ing. Kristýna Valášková zvládnout celou řadu postupů a metod. Samotná příprava 3D modelů je časově náročná, vyžaduje velké pracovní nasazení, kreativitu a trpělivost.

Překvapilo mne, že ve výsledcích jsou uvedeny důvody, které limitovaly experimentální práci (Covid 19). To by patřilo spíše do shrnutí či komentáře školitele. Výsledky jsou prezentovány bez dalšího přesahu. Chybí diskuze. Není zřejmé, co je vlastní přínos studentky a co je jen konstatování, že tento postup byl zvolen podle již známých protokolů. Mohla byste uvést, v čem je novost Vámi připraveného modelu (3D kůže) či podpůrné matrice? Je jistě chvályhodné, že 3D model kůže má praktické využití a používá se ve výuce k zjišťování toxicity látek s aplikací v kosmetice.

3D model kůže je zde charakterizován pouze barvením hematoxylinem-eosinem. Jak byste prokázala typickou stavbu 3D kůže?

Proč při studiu vlivu mikrobiomu na životnost HaCat byla použita metoda využívající trypanovou modř (obrázek 18 a 19), i když v jiných pokusech byla použita MTT metoda (obrázek 20)? Jaký význam mělo měření vlivu bakteriálních lýzátů na životnost v čase 0? Jak si vysvětlujete pozorované rozdíly v tomto čase (obrázek 18, 19 a 20)?

Jak si vysvětlujete změny v obsahu hydroxyprolinu po kultivaci podpůrné matrice s buňkami (různý poměr HDF a myoblastů H9c2)? Nedá se předpokládat, že by měl být obsah hydroxyprolinu nejvyšší po kultivaci s HDF? Znamená to, že kokultivace HDF s H9c2 vede k zvýšení tvorby kolagenu? Jak si vysvětlujete změny hodnot hydroxyprolinu po odstranění buněk? Proč jednou hodnota klesá a jindy roste (Tabulka 2, připravovaný rukopis)? Kolikrát byl proveden experiment? Hodnoty směrodatných odchylek jsou překvapivě nízké při použití uvedené metody, jaké máte pro to vysvětlení?

Připravená podpůrná matrice byla osídlena HDF a H9c2. Buňky byly aplikovány v různém poměru. Jako marker pro posouzení osídlení podpůrné matrice buňkami byl použit aktin, který je tvořen v obou typech buněk. Jak byste odlišila, že se jedná o HDF či H9c2? Nemohly HDF přerůst H9c2 (obrázek 24)? Jak si vysvětlujete změny v genové expresi metaloproteinů a jejich inhibitorů. Koreluje obsah hydroxyprolinu (Tabulka 2) s genovou expresí kolagenu (obrázkem 5B v rukopisu)? Expres kolagenu v HDF a H9c2 je překvapivě stejná (obrázek 5, připravovaný rukopis). Opět zde nejsou uvedeny směrodatné odchylky a kolikrát by experiment opakován.

Formální komentáře a připomínky:

Jsou použity zkratky, které nejsou vysvětleny nebo uvedeny v seznamu zkratk. Popis obrázků a tabulek je velmi stručný. V některých obrázcích je použito velmi malé písmo. Není uvedeno, kolikrát byly experimenty opakovány. Není provedena statistická analýza, i když v textu se uvádí, že výsledky jsou významně odlišné. Není použit jednotný styl k vyjádření koncentrací, otáček při centrifugaci, atd. Experimenty by nebylo možné zopakovat, protože jejich provedení a složení roztoků je popsáno velmi stručně nebo není uveden odkaz na literaturu. U pevných chemikálií jsou uvedeny objemy, které byly použity k přípravě roztoků. MTT metoda se používá k zjištění životnosti buněk (počet buněk) není to standardní metoda pro měření proliferace. Jakou metodu byste zvolila pro měření proliferace?

V práci používáte pojmy jako primární buňky a buněčné linie. Tyto pojmy zaměňujete u Vámi používaných buněk. Mohla byste vysvětlit rozdíl mezi primárními buňkami a buněčnými liniemi a jednoznačně specifikovat, o jaký typ buněk se jednalo ve Vašich experimentech?

Předkladatelka je spoluautorkou 7 prací, které se věnují přípravě biomateriálů a jejich charakterizaci, ale tyto práce nejsou předmětem samotné disertační práce. Dále je první autorkou u rukopisu s názvem „Human-Designed, Cell-Made Scaffolds: Harnessing Co-Cultivation for Custom 3D Tissue Engineering Platforms“, který by měl být odeslán do časopisu s *International Journal of Biological Macromolecules* (Q1). Studentka se aktivně zúčastnila dvou konferencí a byla zapojena do řešení 10 projektů. V průběhu studia vykonala 3 krátkodobé stáže na pracovištích AV ČR, na specializovaném pracovišti pro přípravu 3D

modelů MatTek na Slovensku a také v Biotechnologickém centru, Slezské technologické university v Gliwicích v Polsku.

Protože předložený rukopis neprošel oponentním řízením, množství mých komentářů a poznámek je tedy větší. Škoda, že připravovaný rukopis nebyl součástí spisu, protože část výsledků z rukopisu je uvedena ve spisu.

Práci shledávám jako kvalitní. Studentka prokázala tvůrčí schopnosti a postupně splnila vytýčené cíle. Pokud byly splněny všechny požadavky kladené na studenty doktorského studia v daném oboru, doporučuji práci k obhajobě.

Po úspěšné obhajobě souhlasím s udělením akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci dne 12. srpna 2025


Doc. Mgr. Jitka Vostálová, Ph.D.