

Posudek na disertační práci: Příprava rekonstituovaných tkání, autorky Ing. Kristýny Valáškové.

Předložená disertační práce autorky Ing. Kristýny Valáškové s názvem „Příprava rekonstituovaných tkání“ svou náplní zapadá do aktuální a celosvětově intenzivně rozvíjené oblasti biomedicínského výzkumu regenerace a tkáňové terapie. Autorka se ve své práci zaměřuje na vytvoření modelu kůže, a jeho následné testování na interakci s jednotlivými mikroorganismy kožního mikrobiomu. V druhé části práce, pak autorka navazuje tvorbou „lešení“ z extracelulární matrix sestavenou buňkami v kultuře tzv. Cell assembled extracellular matrix – CAM.

Práce je rozdělena na obsáhlý úvod, který vhodným způsobem uvádí čtenáře do studované problematiky. Následují cíle, metody, vlastní výsledky propojené s diskusí/souhrnem. Práce je také doplněna o popis dalších výzkumných aktivit autorky, v podobě stručného komentáře k článkům, kterých je spoluautorka. Práce je kompaktní, jednotlivé postupy na sebe logicky navazují a cílí na klíčové otázky studované problematiky. Za nejcennější výsledek práce pak považují vlastní přípravu modelu kůže in vitro, a následující testy na interakci mikrobiomu s epidermis na tomto modelu. Obdivuhodné je také množství a náročnost práce kterou autorka odvedla, a také šíře různých metod a experimentálních přístupů, které si musela osvojit. Při podrobnějším pohledu, mám však k práci několik méně, či více významných výhrad.

1. V úvodní části se až příliš opakují informace o významu kůže jako takové. Naopak, bych zde uvítal detailnější informace o imunitním systému v kůži a jeho interakci s epidermis, zejména s odkazem na výsledky a diskusí. Popis vývoje kůže je prezentován sice v přiměřeném rozsahu, možná někdy však až příliš detailně s ohledem na vynechání zmínky o neurální liště a jejím významu, a to zejména s ohledem na deriváty neurální lišty, které autorka jako důležité komponenty kůže zmiňuje. Na str. 15, je pak naznačeno, že epidermis vzniká z neuroektodermu. Z něj se však tvoří neurální ploténka a následně neurální trubice (možná se jedná jen o jeden z mnoha překlepů?).
2. V kapitole věnované metodám bych uvítal katalogová čísla použitých médií a jejich doplňků. Použitá média se prodávají v „X“ modifikacích a pokud je např. v metodě uveden přídatek látky (zde např. L-Glutamin), který ale je ve většině médií standardně, není jasné, jaká je jeho finální koncentrace. Případně u látek, kde koncentrace není uvedena vůbec a jsou distribuovány již v roztoku – HEPES, kolagen. U koncentrace akrylamidu pro SD-PAGE není uveden podíl síťující složky. Není také hned jasné, z jakých článků autorka vychází při realizaci experimentů. Až zpětně čtenáři dojde, že pravděpodobně z prací, které jsou citovány v obecném krátkém úvodu k dané metodě. V metodické části jsou uvedeny i analýzy (část qRT-PCR a western blotu), jejichž výsledky nejsou nikde prezentovány a ani komentovány. Dále, autorka pracuje standardně s buněčnými liniemi HDF, HaCaT a H9c2. Některé postupy popisují využití buněčných linií HEK a AC16, s nimi však výsledky nejsou nikde prezentovány a ani nijak komentovány. Podobně nejsou uvedeny postupy jejich kultivace. Autorka prezentuje výsledky qRT-PCR ze vzorků lidských (HDF) a potkaních buněk (H9c2), uvedené primery jsou však specifické pouze pro člověka.
3. Ve výsledkové části vidím velkou slabinu ve statistickém vyhodnocení získaných dat. Krom jednoho experimentu nikde není. Přesto autorka hojně popisuje významné/nevýznamné rozdíly u stanovených hodnot. Jediná srovnávací statistika je pak použita na morfometrická data k buňkám, kdy se porovnávají jen 2 skupiny vzorků. Přesto autorka tvrdí, že použila ANOVA a Bonferroniho post hoc korekci. Proč? Data jsou na t-test. Popisky obrázků (celkově), jsou nedostatečné. U mnoha není uvedeno, co hodnoty představují, co znamenají uvedené zkratky, kolik bylo opakování, atd... U výsledku Obr. 4 v manuskriptu chybí kontrola v podobě

jednotlivých buněčných linií a postrádám i kvantifikaci zastoupení jednotlivých buněčných linií při směsné kultivaci. Tato informace by dle mne mohla hodně prospět diskusi a závěrům z této studie. Dále v diskusi o CAM z HDF a H9c2 buněk je zmiňován model interakce fibroblastů (HDF) a kardiomyocytů (H9c2). H9c2 jsou přitom považovány za myoblasty, časná vývojová stadia myocytů, fenotypově blíže fibroblastům než funkčním myocytům/kardiomyocytům. Určitě by bylo lépe pro tuto ideu použít opravdové kardiomyocyty případně se buňky H9c2 pokusit do nich diferencovat, pokud je to možné. Jak je prezentováno, považuji tuto diskusi za zavádějící. Jedním z výsledků je i tvrzení, že materiál (CAM) pozbyl imunogennost. Tento předpoklad, však není nikde testován. S tím částečně souvisí i dotaz, co autorka očekávala od detekce kináz pomocí qRT-PCR, ty jsou v buňkách často exprimovány konstitutivně, klíčová je jejich aktivita. Pokud se tedy jedná o nějakou reaktivitu buněk, měl by být použit např. western blot se specifickými protilátkami na aktivní a celkové formy těchto kináz.

Drobnosti:

Autorka by měla mít jasno co zkratkou CAM míní, používá několik termínů. Cell assembled extracellular matrix; Cell-derived extracellular matrix.

Zkratky mikroorganismů bych doporučoval používat kurzívou, rod velkým, druh malým písmem, jak je standardem (SA x *S.a.*; SES x *S.e.* apod.).

Závěrem, i přes výše uvedené připomínky, považuji předloženou práci za kvalitní, autorka prokázala schopnost vědecké práce, a proto práci **doporučuji k obhajobě** s cílem získání titulu Ph.D.

Otázky k diskusi:

1. Kultivace buněk HaCaT, nebyla dle popisu prováděna dle doporučení jejich zdroje. To údajně negativně ovlivňuje jejich fenotyp, podporuje další transformaci do agresivnějšího nádorového fenotypu. Měl tedy změněný způsob kultivace nějaký důvod?
2. Ko-kultivační experimenty s více buněčnými typy jsou vždy velkou experimentální výzvou ohledně výsledků a jejich interpretace. Nelze zde předpokládat zavádějící výsledky, kdy stejné ligandy signálních drah produkované buňkami mohou mít mezidruhově různé odpovědi? Řeší se to v podobně zaměřených studiích? Má s tímto problémem autorka nějakou zkušenost?
3. Při přípravě CAM. Po devitalizaci následovalo její usušení. Nemůže to mít vliv na následné zpracování a třeba zachování imunogenicity, změnu epitopů ECM apod.? Jsou nějaká pro a proti, proč takto postupovat?
4. Jako test cytotoxicity bakterií pro keratinocyty byl použit test aktivity LDH v médiu. Aktivita LDH je však běžná pro všechny organismy. Nemohou proto zbylé přítomné bakterie ovlivnit výsledek tohoto testu?

V Brně 20.8.2025

Mgr. Jiří Pacherník, Ph.D.



Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta

Kotlářská 267/2, 611 37 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 1410, E: info@sci.muni.cz, www.sci.muni.cz