



Oponentský posudek k diplomové práci

Název práce: **Koaxiální nanovlákná s inkorporovanými suplementy pro řízenou chondrogenní diferenciaci.**

Pracoviště: **Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta**

Hodnocení formální stránky práce

Práce je členěna na úvod, teoretickou část, materiál a metody, výsledky, diskusi, závěr a seznam použité literatury. **Úvod** shrnuje význam práce, uvádí cíl práce a popisuje způsob řešení práce. **Teoretická část** přehledně popisuje strukturu chrupavky, metodu kultivace chondrocytů, metody a důležité faktory diferenciaci chondrocytů z mesenchymálních kmenových buněk, a na závěr detailně shrnuje techniky tkáňového inženýrství v regeneraci poškozené chrupavky včetně různých typů používaných materiálů se zaměřením na nanovlákná a jejich přípravu. **Část Materiál a metody** popisuje všechny použité materiály a metody. **Výsledky a diskuse** jsou členěny na 6 různých experimentů lišících se přítomností a koncentrací askorbát-2-fosfátu, dexamethasonu a směsi insulin-transferrin-selen v kultivačním médiu nebo přímo v polykaprolaktonových nanovláknách. **Závěr** stručně shrnuje provedení práce.

Práce je sepsána přehledně a srozumitelně. K formální stránce práce bych měla tyto výhrady:

- Není dostatečně popsán způsob přípravy nanovláknenných nosičů s inkorporovanými diferenciacními faktory – kap. 2.3.
- Testované skupiny jsou popsány A1-A4, D1, D3, atd. Ve statistickém zpracování jsou ale asi označeny jako skupina č. 1, 2, atd., což si musí čtenář domyslet. Možná by pomohla lepší specifikace v popisních grafech.
- Co znamená jednotka u askorbátu-2-fosfátu – např. 25 µl/ml? Toto je použito všude, nemělo se jednat o µg/ml?
- U qPCR chybí jednotky osy Y (množství mRNA).
- V práci je řada nedodělaných detailů, např. místy červeně/žlutě podbarvené texty, u obr. 18 chybí rozdělení na A a B, v kap. 3.3.2.4 (SEM metoda, experiment č. 2) nejspíš chybí obrázek, v dalších experimentech SEM není vůbec, str. 68 tab. č. 6 – v textu tab. č. X; str. 70. obr. č. X...
- Metoda statistického zpracování dat říká, že statistická analýza dat byla udělána pouze u MTS a kvantifikace DNA metody. Dle výsledků byla však udělána i u qPCR.
- Diskuse obsahuje většinou jen popis výsledků a ucelené srovnání všech testovaných experimentálních podmínek chybí.
- Závěr popisuje již známou potřebu vývoje nosičů pro úspěšnou kultivaci a následnou autologní aplikaci chondrocytů. Autorka zmiňuje systém mající za cíl „vytvářet více chondrocytů na nanovláknenné ploše, a tím snižovat dobu kultivace“, což však nebylo v práci přesně řešeno (nebyl studován vliv diferenciacních faktorů na délku kultivace a na kvalitu/kvantitu chondrocytů). V závěru bohužel nejsou shrnuty cíle a výsledky provedené práce.

Hodnocení způsobu řešení práce

Cílem práce bylo popsat vliv různých koncentrací diferenciacních faktorů askorbát-2-fosfátu a dexamethasonu na adhezi, proliferaci a diferenciaci prasečích chondrocytů kultivovaných na trojrozměrných polykaprolaktonových nosičích. Diferenciacní faktory askorbát-2-fosfát a dexamethasonu byly přidány buď do kultivačního média, nebo zvlákněny do nosiče.

Autorka izolovala primární chondrocyty z prasečí chrupavky, kultivovala je na polystyrenových kultivačních lahvích, a po jedné pasáži byly použity do experimentu. Nanovláknenné polykaprolaktonové nosiče byly připraveny odstředivým zvlákněním. K hodnocení úspěšnosti kultivace a diferenciaci chondrocytů autorka

zvolila metody MTS (sledování metabolické aktivity), kvantifikace DNA (sledování proliferace), fluorescenční konfokální mikroskopie (sledování adheze a exprese prokolagenu typu II), skenovací elektronové mikroskopie (sledování morfologie nanovlákných nosičů), a qPCR (sledování hladin mRNA pro kolagen typu I, kolagen typu II a aggrecan). Pro statistické zhodnocení výsledků, tj. pro srovnání několika skupin mezi sebou, autorka použila metodu ANOVA s několika post-hoc testy stanovující signifikantní rozdíly mezi konkrétními skupinami.

Autorka ve své práci provedla velké množství experimentů a srovnala velké množství různých experimentálních podmínek s použitím řady metod. Všechny použité metody byly zvoleny správně, v souladu cíli práce. Ke zvoleným metodám a k jejich provedení bych měla následující výhrady:

- Práce má za cíl definovat vhodné chondrogenní diferenciacní faktory. Práce je však provedena s již diferencovanými chondrocyty izolovanými z chrupavky dospělého prasete.
- U poly-kapronových nanovláken obsahujících diferenciacní faktory askorbát-2-fosfát a dexamethasonu není popsána kinetika jejich uvolňování do kultivačního média, a nelze tedy přesně popsat jejich koncentraci v médiu a srovnat jejich účinek s účinky faktorů do média přímo přidaných (graf č. 22 a 23).
- Jako znaky fenotypu chrupavky byly zvoleny proteiny kolagen typu I, kolagen typu II a aggrecan. Kolagen typu I je však spíše znak fibroblastů, tj. buněk, které mohou izolované chondrocyty kontaminovat při izolaci, nebo do fibroblastového fenotypu mohou chondrocyty s délkou kultivace de-diferencovat, což sama autorka správně na několika místech zmiňuje v teoretické části.
- Z práce nevyplývá, co přesně znamená opakování experimentu. Zda údaj „vzorek“ v kap. 2.14 znamená vzorek nosiče nebo vzorek primárních chondrocytů izolovaný z jednoho prasete.
- Ve statistickém zpracování dat není popsáno, zda naměřená data splňují předpoklady pro použití metody ANOVA (normalita dat a homogenita rozptylu).

Otázky k diplomové práci

- 1) Na str. 61 (předposlední řádek) autorka říká „*Ze skupin se do chrupavčité morfologie nejvíc blížila pozitivní kontrola PL.*“ Dle čeho toto autorka soudí, protože je zároveň výrazně exprimován kolagen typu I, což je znak fibroblastového fenotypu? Jaký jiný parametr by se dal použít k posouzení stálosti fenotypu chondrocytů v kultuře, tj. ke kontrole toho, že se nemění např. právě na fibroblasty? Proč autorka zvolila k testování diferenciacních médií již diferencované chondrocyty a nikoliv např. mesenchymální kmenové buňky, která sama v teoretické části práce zmiňuje?
- 2) Byla např. v jiné práci studována kinetika uvolňování použitých diferenciacních faktorů z poly-kapronových nanovláken do kultivačního média? Jaká je stabilita těchto faktorů ve vláknech a v kultivačním médiu? Jaká je přesně funkce diferenciacních faktorů ve Vašem systému – podpořit diferenciaci chondrocytů, a nebo udržet již jejich diferencovaný stav a funkci chondrocytů?
- 3) Jaké byly výtěžky izolace chondrocytů z prasečí chrupavky (např. buněk/g tkáně)? Jaká byla viabilita chondrocytů ihned po izolaci? Je známo z literatury např. počet chondrocytů na mm³ chrupavky? Nebylo by pro účely zkrácení a jednoduchosti postupu přípravy 3D nosičů s autologními chondrocyty izolované chondrocyty nasadit rovnou do 3D nosičů a vynechat několikadenní „*před-kultivaci*“ na 2D plastu? Pro ANO i NE vysvětlíte Vaši odpověď.

Závěrečné hodnocení práce

Autorka provedla rozsáhlou studii různých chondrogenních diferenciacních médií v kombinaci s metodami tkáňového inženýrství. Prokázala schopnost realizovat složitější experimenty, vyhodnotit a interpretovat jejich výsledky. I přes výše zmíněné formální a experimentální nedostatky **DOPORUČUJI** práci k obhajobě a hodnotím ji jako **VELMI DOBRĚ (B)**.

V Plzni, dne 8. 9. 2018

Lucie Vištejnová, Ph.D.
Lékařská fakulta v Plzni
Univerzita Karlova