

Oponentský posudek k diplomové práci

Název práce: **Koaxiální nanovlákná s inkorporovanými suplementy pro řízenou chondrogení 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 cíle a hypotézy práce a popisuje způsob řešení práce. **Teoretická část** přehledně popisuje strukturu chrupavky, metodu kultivace chondrocytů, metody a důležité faktory a signální dráhy 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 poly-kaprolaktonových nanovláknách. **Závěr** shrnuje provedení práce a uvádí závěry z práce vyplývající.

I přes velký objem experimentů je práce sepsána přehledně. K formální stránce práce bych měla tyto výhrady:

- Části práce jako je abstrakt nebo grafy s jejich popisky nejsou všerhající samy o sobě. Zejména se to týká grafů qPCR. Aby čtenář pochopil, jaké skupiny byly srovnávány, a co popisky skupin znamenají, musí hledat v dalším textu.
- Cílem práce je zjistit vhodné koncentrace askorbát-2-fosfátu a dexamethasonu na udržení chondrocytového fenotypu. Z abstraktu práce se čtenář nedozví, jaké koncentrace byly testovány a jaké koncentrace vyšly jako nejvhodnější.
- Slabinou diskuse je neustálé používání zkratk testovaných roztoků. Protože testovaných roztoků je velké množství, čtenář brzy ztratí pojem, co která zkratka znamená, resp. co který roztok obsahuje, a ztrácí se obecná informace o účincích askorbát-2-fosfátu a dexamethasonu na udržení chondrocytového fenotypu.
- V diskusi nedoporučuji používat odkazy na grafy. Diskuse má zobecnit pozorování z experimentů a srovnat je se současnými poznatky.
- Na některých místech, zejména u výsledků qPCR, nejsou správně formátovány grafy a text – grafy jsou vloženy do textu a konce vět textu jsou za grafy, příklad na str. 71 nebo 75.
- V práci se ještě vyskytují drobné nedodělky, např. 2x Tabulka č. 3 na str. 50 a 58; v kapitole 2.6 je věta „*Toto médium je popsáno v kapitole 4.4 Izolace chondrocytů.*“ – je to kapitola 2.4; např. u grafů č. 1, 23, 24 chybí vysvětlení, jaké číslo je která skupina.

Hodnocení způsobu řešení práce

Cílem práce bylo popsat vliv různých koncentrací diferenciacních faktorů askorbát-2-fosfátu a dexamethasonu na udržení chondrocytového fenotypu u prasečích chondrocytů kultivovaných na trojrozměrných poly-kaprolaktonových 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 až třetí pasáži byly použity do experimentu. Nanovlákněné poly-kaprolaktonové 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 nanovláknenných nosičů), a qPCR (sledování hladin mRNA pro kolagen typu I, kolagen typu II a agrekan). 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, k jejich provedení a k interpretaci získaných výsledků bych měla následující výhrady:

- V práci chybí úvaha nad tím, co znamená zvýšení či snížení exprese mRNA pro kolagen typu I a II ve smyslu udržení fenotypu chondrocytů.
- Práce měla za cíl zjistit, za jakých podmínek složení kultivačního média je nejlépe udržován fenotyp chondrocytů, a k tomu je použita metoda sledování exprese znaků chondrocytů – kolagen II a agrekan. Během experimentu ale nebyla měřena tato exprese ve více časových bodech (kromě experimentů 5 a 6) či na začátku experimentu, aby se dalo říci, zda se jejich exprese délkou kultivace a vlivem složení kultivačního média mění nebo nemění.
- Pro přesnější statistické vyhodnocení doporučuji příště použít chondrocyty z více zvířecích jedinců. Použití primárních buněk z jednoho jedince může být zatíženo vlastnostmi, které jsou typické jen pro tohoto jedince a nikoliv pro celou populaci, nebo alespoň vzorek populace.

Otázky k diplomové práci

- 1) Jaká existuje souvislost mezi expresí kolagenu typu I a II u chondrocytů? Co mohou znamenat nárůsty a poklesy exprese těchto genů?
- 2) Jak jinak by se dalo navrhnout řešení diplomové práce, pokud by v zadání bylo, že autor může otestovat jen 3 experimentální podmínky? Jaké podmínky z již otestovaných v této práci by pro nové řešení autorka vybrala? Zaměřte se na a) výběr kultivačních podmínek (složení média a s/bez inkorporace faktorů do vláken), b) na počet opakování pro statistické hodnocení a c) na časy, ve kterých by mohly analýzy probíhat.
- 3) V diskusí na str. 114 autorka píše: „Zlepšení proliferace a exprese markrových molekul může být způsobeno zlepšenou biosyntézou a maturací ECM. Maturace ECM je důležitým signálem pro růst chondrocytů. Při diferenciaci chondrocytů jsou pozorovány chondrogenní markery – především exprese a depozice kolagenu typu II, agrekanu či sulfatovaných proteoglykanů.“ Jakou další metodu lze zvolit pro kontrolu stability chondrocytového fenotypu založenou na předpokladu produkce proteoglykanů chondrocyty?
- 4) Podle čeho autorka soudí, že se askorbát-2-fosfát uvolňuje z vláken postupně? Viz. grafy 23 a 24.
- 5) Ve většině výsledků qPCR analýz lze pozorovat nárůst exprese genu pro kolagen I v jednotkách až desítkách, u kolagenu II a agrekanu to jsou jen desetiny až tisíce. Jak si autorka tento rozdíl v jednotkách vysvětluje?

Závěrečné hodnocení práce

Autorka provedla rozsáhlé testování různých chondrogenních diferenciacních médií. Získala zkušenost s metodami buněčné a molekulární biologie, a dále s tématem tkáňového inženýrství. Prokázala schopnost realizovat složitější experimenty, vyhodnotit výsledky a pokusit se o jejich interpretaci. I přes výše zmíněné formální a experimentální nedostatky **DOPORUČUJI** práci k obhajobě a hodnotím ji jako **VELMI DOBRĚ (B)**.

V Plzni, dne 6. 2. 2019

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