

Posudek diplomové práce

STUDIUM VLIVU MECHANICKÉ ZÁTĚŽE NA DIFERENCIACI KMENOVÝCH BUNĚK NA HLADKÉ SVALOVÉ BUŇKY

Předkládaná Bc. Šimonem Pražákem, posluchačem Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, studijního programu: Biologie a studijního oboru: Buněčná a vývojová biologie – fyziologie buňky

Struktura a obsah DP

Autor se v práci věnuje aktuální a důležité problematice tkáňového inženýrství s využitím autologních kmenových buněk z tukové tkáně. Řízení diferenciaci kmenových buněk na hladké svalové buňky pomocí mechanické stimulace je přínosné pro další použití u cévních a chlopenních náhrad.

Práci představuje 68 textových normostran rozčleněných do 7 kapitol. V literárním úvodu autor ve 2 kapitolách podává přehled o kardiovaskulárním systému, struktuře a funkci cév, kardiovaskulárních onemocněních, vaskulárním tkáňovém inženýrství, nosičích používaných v tkáňovém inženýrství, jejich vlastnostech, o kmenových buňkách z tukové tkáně, jejich využití, o hladké svalovině, diferenciaci buněk hladké svaloviny, jejich regulaci rozličnými stimuly včetně mechanické stimulace a o markerech diferenciaci hladkých svalových buněk.

Další část diplomové práce tvoří experimentální část se standardním dělením na cíle, materiál a metody, výsledky, diskuse a závěr.

V diplomové práci jsou vytyčeny 3 cíle: 1) nalézt optimální dynamické podmínky potřebné pro diferenciaci kmenových buněk z tuku na hladké svalové buňky, 2) analyzovat stupeň jejich diferenciaci směrem k hladkým svalovým buňkám pomocí specifických markerů diferenciaci hladkých svalových buněk a 3) analyzovat produkci extracelulární matrix.

V kapitole Materiál a metody je podrobně popsán postup izolace a kultivace prasečích kmenových buněk, postup optimalizace dynamické kultivace buněk a úpravy nosičů, jako jsou decelularizace perikardu a plazmování skla. Dále je zde popsán postup imunofluorescenčního barvení, elektroforézy SDS PAGE, Western blotu a použitých mikroskopických technik.

Během dynamické kultivace se autor musel vypořádat s různými problémy, zejména odtržením vrstev buněk od podložky, a postupně optimalizovat podmínky kultivace kmenových buněk z tukové tkáně. Důležitým se ukázala úprava povrchu skla plazmou nebo potahováním tenkými vrstvami fibrinu, přičemž jako vhodný se ukázal i decelularizovaný prasečí perikard. Jako nevyhnutelné se ukázalo také snížení násady buněk i aplikované dynamické zátěže.

Diferenciaci kmenových buněk z tukové tkáně směrem k hladkému svalu byla hodnocena imunofluorescenčním barvením na alfa-aktin, h1-calponin, SM myosin heavy chain a pomocí Western blotu. Pozitivita byla prokázána jenom u alfa-aktinu a calponinu. Obsah obou markerů byl významně vyšší v buňkách kultivovaných dynamicky 3. den. 7. den byl nárůst pozorován během dynamické kultivace jenom u alfa-aktinu.

Produkce mezibuněčné hmoty byla hodnocena barvením na kolagen I a fibronectin 3. a 7. den. Množství obou proteinů nebylo kvantifikováno.

Autor v práci cituje více než sto odborných publikací.

Celkové hodnocení, připomínky a otázky:

Bc. Šimon Pražák při diplomové práci postupoval samostatně, systematicky a prokázal schopnost kritického myšlení. Zejména část optimalizace podmínek dynamické kultivace vypracoval velmi důkladně. Na druhé straně zde chybí kvantifikace proteinů mezibuněčné hmoty. K diplomové práci mám následující otázky:

Je možnost použít i jiné složení diferenciačního média?

Jak se liší myofibroblasty a hladkosvalové buňky?

Jaký dlouhý čas předpokládáte na diferenciaci ASC do hladkých svalových buněk?

Závěr:

Diplomovou práci Bc. Šimona Pražáka doporučuji k obhajobě. Klasifikuji velmi dobře.

Mgr. Elena Filová, Ph.D.
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.
Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství
Václavská 1083,
142 20 Praha 4

V Praze 10.9.2019