

doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Ústav histologie a embryologie

1. lékařská fakulta – Univerzita Karlova

Albertov 4, Praha 2, tel.:+420224968130, email:tkucer@lf1.cuni.cz

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Hany Hřebíkové v oboru Anatomie, histologie, a embryologie s názvem: “Decelularizace a recelularizace tkání“.

Disertační práce Mgr. Hany Hřebíkové se opírá o experimentální studie, které můžeme řadit do několika biomedicínských oborů, jako jsou tkáňové inženýrství, výzkum kmenových buněk a regenerativní medicína. Pro úspěšnou realizaci tkáňových náhrad se coby klíčový moment jeví snadné začlenění a připojení implantátu k tkáním příjemce bez vyvolání zánětlivé odpovědi. Na základě dosavadního stavu poznatků tkáňového inženýrství se autorka dizertace zaměřila na důležitou roli ECM z hlediska jejího regeneračního potenciálu. Zdá se, že právě příprava vhodného skafoldu sestávajícího z ECM původně intaktní tkáně může být vhodným stimulem regenerace. V rámci dizertace byly vypracovány a vzájemně porovnávány různé techniky přípravy takových skafoldů. Na tyto metodické práce autorka dále navázala jak experimenty zahrnujícími kultivaci buněk a skafoldů *in vitro*, ale i implantaci skafoldů experimentálnímu zvířeti. Pro hodnocení experimentálních výsledků autorka použila různé histologické, imunohistochemické, elektronmikroskopické, biochemické a molekulárně-biologické metody a analýzy. Zvolené téma dizertace je vysoce aktuální a potřebné pro další rozvoj regenerativní medicíny a svou povahou zcela odpovídá zaměření příslušné oborové rady.

Jaké konkrétní cíle si tedy autorka ve své disertační práci vytyčila?

- 1) Připravit dostatečně efektivní a zároveň šetrný decelularizační protokol k odstranění buněk z kosterní svaloviny.
- 2) Provést histologickou a biochemickou evaluaci připraveného skafoldu kosterní svaloviny.
- 3) Stanovit kompatibilitu připraveného skafoldu s různými buněčnými kulturami v experimentech *in vitro*.

4) Stanovit kompatibilitu připraveného skafoldu *in vivo*.

Práce Mgr. Hřebíkové přinesla tyto původní výsledky:

1) Autorka vypracovala modifikovaný decelularizační protokol pro přípravu skafoldu z kosterního svalu. Tento skafold měl maximálně zachovalou strukturu a byl úspěšně decelularizován.

2) Testování interakce mezi čtyřmi různými buněčnými liniemi s promyogenním charakterem a skafoldem ukázalo jeho výbornou kompatibilitu.

3) Z hlediska úspěšnosti recelularizace se jako nejlepší buněčná linie ukázaly C2C12 myoblasty a myogenní progenitorové buňky diferencované z indukovaných pluripotentních kmenových buněk.

4) Po implantaci skafoldu do poškozeného svalu došlo k jeho bohaté recelularizaci

Všechny tyto původní výsledky považuji za cenný příspěvek, který rozšiřuje naše znalosti o možnostech vývoje tkáňových náhrad. Poznatky získané v této dizertaci přímo vyzývají k pokračování experimentální práce, a to zejména směrem k další modifikaci experimentálních protokolů a charakterizaci buněčných populací, které jsou využívány pro recelularizaci skafoldu. Použité metody byly adekvátní a vytčené cíle byly splněny.

Po formální stránce má disertační práce Mgr. Hany Hřebíkové formu samostatné práce, která se opírá o několik publikací, jichž byla dotyčná první autorkou nebo spoluautorkou. Práce splňuje požadovaná formální kritéria. Práci tvoří 101 stran textu s bohatou obrazovou dokumentací dobré kvality, která zahrnuje 21 obrázků. Bohatě citovaná související literatura tvoří seznam na 23 stranách textu.

Disertační práce je uspořádaná podle obvyklého způsobu. Obsahuje úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr, seznam zkratk a použitou literaturu. Domnívám se, že práce mohla navíc obsahovat též české a anglické shrnutí, jak je tomu u autoreferátu

disertační práce autorky. Myslím, že by také bylo vhodné formulovat určité vědecké hypotézy, zejména ve vztahu k použitým buňkám s myogenním potenciálem. Po jazykové stránce je práce vyhovující, kromě několika výtek uvedených níže, a práce také obsahuje minimum překlepů.

Zásadní výhradou oponenta vzhledem k překládané práci je, co se metod týče, absence kvantitativního přístupu zejména při hodnocení histologického obrazu recelularizace skafoldu. Část práce věnovaná *in vivo* pokusu s implantací skafoldu je spíše pilotní studií a buňky infiltrující do skafoldu mohly být přesněji charakterizovány histologicky (mononukleární infiltrát vs. polymorfonukleáry) nebo pomocí imunohistochemie.

Dále mám některé připomínky méně zásadního charakteru:

- v Úvodu mohly být podrobněji představeny buňky s myogenním potenciálem, které pak byly použity pro recelularizaci skafoldu
- na straně 12 se laminin chybně řadí k vláknitým proteinům ECM
- v Úvodu se rovněž praví, že kolagen je nejvíce zastoupený protein ECM, nicméně by bylo vhodné specifikovat typ kolagenu
- na straně 35 není odkaz v textu na Obr. 1
- na straně 57 chybí odkaz na Obr. 13
- formulace v legendě obr. 13 „obrázky barvené H-E“ a „parafinové řezy znázorňují“ jsou poněkud neobratné
- V diskusi autorka tvrdí, že nebyla pozorována apoptóza buněk infiltrujících do skafoldu, ale toto tvrzení není doloženo ve výsledcích.
- Autorka použila pro znázornění aktinu v buňkách, které infiltrovaly skafold, phalloidin a na základě pozitivního značení usuzuje na svalový fenotyp buněk. V tomto případě měla být spíše použita protilátka proti svalovému aktinu.

Doplňující dotazy k obhajobě:

- 1) Proč byly buňky na začátku kultivace přítomny pouze na povrchu skafoldu, když byly aplikovány injekčně do jeho nitra?
- 2) Jaký je přesný původ muscle derived stem cells? Které buňky ze směsné populace MDSc PP4 a PP6 zůstaly na povrchu a které migrovaly dovnitř skafoldu? Byly skutečně vidět myotuby?

3) Obrázek 17 ukazuje (na vytištěném obrázku v dizertaci poněkud nezřetelně) expresi myogeninu a Pax3 v myogenních progenitorových buňkách 14 dní po kultivaci. Byly tyto proteiny exprimovány také 7. den kultivace?

4) Jakou má autorka hypotézu pro možnou tkáňově specifickou roli ECM ve skafoldu? Je možné předpokládat, že svalové buňky, cévní pupeny a nervová vlákna budou specificky vrůstat do příslušných ECM struktur stejného původu?

5) Jaký typ lamininu rozpoznávala v dizertaci použitá protilátka?

Závěrem konstatuji, že disertace Mgr. Hany Hřebíkové je kvalitní prací a prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci. Proto tuto práci jednoznačně **doporučuji** k obhajobě a po jejím úspěšném vykonání i udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. autorce – Mgr. Haně Hřebíkové - podle platných právních předpisů.

V Praze dne 31.5.2018.

doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.