

OPONENTNÍ POSUDEK

Práce: **KOŽNÍ EKVIVALENTY V ZÁKLADNÍM A APLIKOVANÉM VÝZKUMU**

Autor: **MUDR. BLANKA HAVLÍČKOVÁ**

Pracoviště: **DERMATOVENEROLOGICKÁ KLINIKA FNKV a 3. LF UK
ŠROBÁROVA 50
100 34 PRAHA 10
ČESKÁ REPUBLIKA**

**KLINIK UND POLIKLINIK FÜR DERMATOLOGIE
UND VENEROLOGIE
UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF
MARTINISTRABE 52
20246 HAMBURG
DEUTSCHLAND**

Školitel: **PROF. MUDR. PETR ARENBERGER, DRSC., MBA
DERMATOVENEROLOGICKÁ KLINIKA FNKV a 3. LF UK
ŠROBÁROVA 50, 100 34 PRAHA 10**

Charakteristika:

Práce je vázaná v pevných deskách, celkem 107 stran, 89 stran textu i dokumenty k vlastní práci (tabulky, grafy, obrázky včetně barevných). Práce je vyhotovena v jazyku anglickém. Anglická verze je na vynikající stylistické úrovni. Ve zbývajících částech jsou uvedeny literární odkazy, seznam publikačních aktivit. Tisk je na kvalitním papíru.

Předřazen je obsah. Vlastní práce s referencemi je uspořádána do deseti částí. První čtyři části jsou věnovány seznamu užitých zkratk, úvodu, části zabývající se problematikou kožních ekvivalentů a biologii vlasového folikulu. Pátá část je věnována cílům studie s určením kritérií pro vývoj folikuloidního ekvivalentu. Šestá část se zabývá užitými materiály a metodami, sedmá část je pak zaměřena na vlastní experimentální práci včetně výsledků a diskuzi. Zbývajících částí se věnují závěrům experimentální studie, souhrnu poznatků a referencím.

Citované odkazy jsou řazeny v odkazech dle abecedního pořadí autorů (celkem 211 citací s převahou prací publikovaných v posledních 10 letech). Obrazová část zahrnuje 19 obrázků /Figures 1 až 19/ (fota mikroskopická, přehledné obrázky, grafy i tabulky). Obrázky 1 až 6 se týkají biologie vlasového folikulu a metodik užitých ke studii, 7 až 19 pak představují výsledky studované problematiky (mikroskopické fotografie, sloupcové diagramy, 1 lineární graf a tabulky). Obrázky jsou řazeny dle pořadí a umístěny v textu k příslušné problematice.

Závěrečné části (11 a 12) jsou věnovány odkazům na publikované práce autorky (se vztahem i bez vztahu k projednávané problematice) a poděkování autorky odbornému školiteli a spolupracovníkům.

Po formální stránce je zpracování textu s minimálními připomínkami – viz níže přehled připomínek.

Hodnocení:

- a) Téma je velmi aktuální v souladu se zaměřením současných dermatologických výzkumů i s činností uchazečky.
- b) Disertační práce si vytkla za cíl vývoj reprodukovatelných orgánově typických folikuloidních systémů poskytujících standardně definované základní parametry (minimálně šest definovaných kritérií) k výzkumu epiteliálně-mesenchymálních interakcí v lidském vlasovém folikulu k pochopení molekulárních procesů růstu a vývoje vlasů. Tyto systémy by měly sloužit i jako skriningové nástroje pro výzkum potencionálních lékových modulátorů vlasového růstu a měla by být prokázána u účelnost systémů v identifikaci cílových genů i celého profilu genové exprese.
- c) Výsledky byla zpracovány odpovídajícím způsobem za použití statistických metod a v práci samotné názorně a přehledně prezentovány.
- d) Výsledky disertační práce vykazaly vývoj **3 nových organotypických folikuloidních systémů**: „vrstveného sendvičového“ /modifikace 3D systému dle Limata a Starka, submerzní růst/, „smíšeného sendvičového“ (optimální, nově vyvinutý folikuloidní 3D systém, submerzní růst/ a „mikrosférického systému“ /unikátní patentovaná nový 3D systém/. **Všechny vyvinuté systémy splnily základní kritéria pro „folikuloidní“ orgánově typické systémy** napodobující epiteliálně-mesenchymální interakce lidských vlasových folikulů. Keratinocyty zevní kořenové pochvy proliferovaly ve všech systémech nezávisle na přítomnosti kalciových iontů či séra, zatímco proliferace a apoptóza buněk dermálních papil byla ve všech systémech dependentní na množství séra a kalciových iontů v kultivačním médiu. Výsledky studie poskytují prvé systematické srovnání různých médií v základních parametrech lidských „folikuloidních“ orgánově typických kultur. Definované optimální podmínky růstu v těchto 3 D systémech zjednodušují optimalizaci úsilí při vývoji systémů dokonale napodobujících situace *in vivo*.
Nově patentovaný mikrosférický lidský folikuloidní systém (HFM), vybraný jako neoptimálnější, vykázal vysokou reprodukovatelnost a za příslušných podmínek kultivace (médiu bez přítomnosti séra a s nízkým obsahem kalciových iontů) udržel základní charakteristiky lidského vlasového folikulu. Příprava systému je snadnější a rychlejší (příprava během hodin versus dny u „sandwich“ typů) než „sandwichové“ systémy a umožní dosažení vyšších denzit DPC elementů. Navíc i ekonomické parametry jsou nepoměrně příznivější ve srovnání se „sandwichovými“ technikami. Při sledování rozdílných markerů, jako např. proliferace, apoptózy, určení cytokeratinu-6 a versicanu /proteoglykanu extracelulární matrix přítomného v řadě tkání/, expresi proteinů a genů v různých buněčných populacích, **umožnil tento systém standardizované preklinické hodnocení testovaných látek na příslušné markery růstu lidských vlasů za podstatně zjednodušených *in vitro* podmínek napodobujících situace *in vivo*.** Nabízí také efektivní systém určený k identifikaci nových cílových antigenů pro případná vlasová léčiva. I přes určitá omezení v rychlé analýze řady vybraných parametrů **je tedy možné považovat systém za nový a jedinečný experimentální systém pro základní a aplikovaný preklinický výzkum humánních systémů.**
- e) Práce má velký přínos pro budoucí klinickou praxi. Obohacuje vyšetřovací postupy u kožních chorob, které postihují značnou část populace a v řadě případů mohou vést i k psychickým alteracím postižených jedinců. V dnešní době dermatologického výzkumu, zaměřeného podstatně na imunologické, biologické, genetické a molekulárně-biologické aspekty kožních onemocnění, znamená vývoj

reprodukovatelných, standardizovaných a, pokud možno, jednoduchých metod velký pokrok v pochopení etiopatogeneze dermatologických jednotek a umožňuje tak i lépe cílenou terapii těchto jednotek.

f) *Připomínky zpracované tabelárně:*

Strana 3, Training site, Supervisor	Chybí písmeno "g" v anglickém termínu "Department of Dermatovenerology, dále není asi zcela vhodné ponechat německé spojky v jinak anglickém termínu německého pracoviště a konečně výše uvedené anglické znění pro termín „Venerologie“ platí i v dalších spojeních na téže straně. Spíše by ale byl vhodný /jde-li o německé pracoviště/ původní německý název – „Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie“.
Strana 13, sekce 3.2.5. „Cultured Skin Substitute“, 2. řádek	„Hansbrough ⁶¹ further.“ V citované literatuře je jméno Hansbrough
Strana 15, 3. řádek	„... can heal itself, following an(d) injury“
Strana 17, 3. řádek	Snad lépe ? ... “In these systems cells were layered above”...
Strana 17, 2. odstavce, 5. řádek	Záměna písmen: previously místo previoully
Strana 20, popis obrázku 1	Anagen VI hair follicle – označení VI se pravděpodobně týká VI. morfologické subfáze anagenního cyklu
Strana 21, popis obrázku 2, 3. řádek	... „amp denotes“...., správně zkratka apm dle předchozích uvedení a dle seznamu zkratk (arrector pili muscle)
Strana 26, sekce 4.5 „Key Factors in Hair Follicle Cycling“, 2. odstavce, 2. řádek	Vhodné by bylo definovat „noggin“ jako protein důležitý pro regulaci buněčné diferenciaci (ovlivnění indukce anagenní fáze vlasového růstového cyklu neutralizací BMP4 ?). Dle obrázku č. 4 jde o důležitý „molekulární hráče“ v kontrole růstového cyklu vlasu
Strana 28, obrázek 4, zkratky u obrázku „Anagen VI“	Název „NOTCH“ v obrázku 4, fáze anagen VI – bylo by vhodné uvést, že jde o buněčný signální systém s funkcí v buněčné diferenciaci
Strana 39, Sekce 6.5 „Immunofluorescence“, 12. řádek	Přehozená písmena: ...“; rabbit anti-transfromig growth factor“.... transforming
Strana 42, sekce 6.9 „Statistical analysis“, 2. řádek	Označení „TUNEL“ není ve zkratkách definováno, jde o techniku detekce apoptotických buněk speciální barvicí technikou - the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL); metoda značící fragmenty DNA jako charakteristiku apoptotických buněk.
Strana 43, sekce 7.1.1 „Introduction“, konec 1. odstavce	Chybí ukončení závorkou - ... much better understood ^{27,145,195}).

<p>Strana 45, úvod experimentální práce, poslední odstavec strany</p>	<p>„Cílem studie byl vývoj folikuloidních 3D systémů splňujících všech 6 výše uvedených kritérií“. V textu výše jsou uvedeny minimální kritéria v odstavcích číslovaných 1. až 4. Lépe by bylo definovat jednoznačně přesný výčet kritérií se značením 1. až 6.</p> <p>Byla autorkou tvorba ideálně koncentrických buněčných seskupení z epiteliálních HF buněk považována za 5. minimální kritérium /zahrnuto ale v pořadí jako 3. kritérium v odstavci 2 na straně 44/ a přítomnost kolagenu typu 1 podporující interakce ORSK a DPC za kritérium číslo 6 /zahrnuto v odstavci 3 na straně 44/ Šest minimálních kritérií je takto dále definováno v bodech 1 až 6 ale až na straně 48-49. Navíc ve druhé části experimentální práce /vývoj mikrosférických lidských folikuloidních systémů pro skrining a výzkum základního a aplikovaného výzkumu vlasů/ na straně 61 v kapitole „Úvod“ jsou základní kritéria pro orgánově typické systémy asociované s vlasovou biologii definována v 5 bodech (tato definice shrnutá v pěti bodech ale vyplývá i ze závěrů první části studie).</p>
<p>Strana 52, sekce 7.1.2 „Results“, poslední odstavec</p>	<p>Největší rozsah apoptózy byl pozorován v médiu 1 (high Ca, FC +), zatímco redukce koncentrace Ca v médiu 3 významně snížila počet TUNEL pozitivních /apoptotických/ buněk . To odpovídá obrázku 8D. Nicméně v závorce je dodatek vysvětlující, že odstranění séra /FC/ zřetelně, i když ne významně též snížilo počet TUNEL pozitivních buněk – v grafu 8D je počet apoptotických buněk nižší zejména díky odstranění séra /FC/, z média , zatímco rozdíly v koncentraci Ca jsou minimální, ba počty apoptotických TUNEL pozitivních buněk se zdají být velmi mírně /ne významně, no asterisk mark/ vyšší u média s redukovaným obsahem Ca. Lze tato fakta vysvětlit ?</p>
<p>Strana 56, obrázek 10</p>	<p>Značení buněčných jader „DAPI“ /DAPI fluorescence = modrá fluorescence/ - objasnění zkratky DAPI = 4",6 - Diamidino - 2 - phenylindole, dihydrochloride, metoda DNA značení.</p>
<p>Strana 65, sekce 7.2.2 „Results“</p>	<p>Lze vysvětlit proč CRH jako potentní inhibitor růstu HF neovlivnil apoptotické děje? Nedošlo totiž dle interpretace výsledků na rozdíl od všech dalších testovaných inhibitorů růstu k poklesu Ki67 pozitivních buněk v CK6 pozitivních ORSK, CRH ani nevykázal vliv na stimulaci apoptózy na DPC /apoptotické TUNEL pozitivní buňky v ORS, v 10. dnu dokonce sníženy ve srovnání se 7. dnem/ buňky.</p>
<p>Strana 68, sekce 7.2.2 „Results“, 3. odstavec, 1. věta</p>	<p>„The above data, as mentioned above, <u>was</u> obtained“ ...→ .. „<u>were</u> obtained“... /užití singuláru u pomnožného substantiva/</p>

<p>Strana 74, tabulka 3 – „Alterace v expresi určitých genů v HFM při inkubaci se 17β Estradiolem (10⁻⁶)“; 5. řádek - protein kináza cβ1, 4. sloupec – poznámky</p>	<p>Zkratka „HaCaT“ buňky – Není uvedena v zkratkách. Definice: buněčná linie lidských keratinocytů HaCaT (Human keratinocyte cell line) v zásadě exprimuje všechny epidermální diferenciacní markery ale vykazuje nedostatky v organizaci tkáni zejména v organotypických ko-kulturách s fibroblasty. Mechanismy diferenciacce tkáně normálních keratinocytů interakcemi stromatu jsou u HaCaT buněk narušeny.</p>
<p>Odkazy k literatuře</p>	<p>Práce č. 13, 52, 81, 85 a 144 uvedené v literárních referencích nemají příslušné odkazy v textu. Odkaz na práci č. 13 by mohl být uveden na str. 26 či 27 v sekcích 4.4 a 4.5. Odkaz na práci č. 52 by mohl být uveden v části 7.1.1 „Úvod“ experimentální části práce /zabývá se epiteliálně-mesenchymálními interakcemi regulujícími růst a diferenciaci keratinocytů in vitro/. Odkaz na práci č. 81 zabývající se buněčnou migrací ve vlasovém folikulu by též mohl být uveden v této sekci (viz výše). Odkaz na práci č. 85 zabývající se selektivní aktivací promoteru versicanu epiteliálně-mesenchymálními interakcemi během vývoje vlasového foliklu je totožný svým obsahem s odkazem č. 86 (publikován v jiném odborném periodiku, autorský kolektiv pouze z části totožný). Odkaz na práci č. 144 zabývající se imunologií vlasového folikulu autora Pause R. není uveden v textu (tato práce se zabývá antiinfekční obranou, ovlivněním růstu vlasů imunomodulačními látkami, sekvestrací folikulárních autoantigenů, fokusace na imunitní systém myších vlasových folikulů HIS).</p>

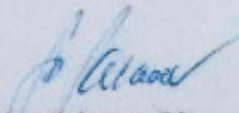
- g) MUDr. Blanka Havličková prokázala **vynikající tvůrčí schopnosti**, její **vlastní práce i předchozí publikační aktivita rozhodně splňují požadavky kladené na disertační práce** v oboru dermatovenerologie.

Závěr:

Výše uvedené připomínky nejsou zásadního charakteru, mohou být předmětem diskuze v rámci obhajoby a zcela jistě nevedou k nutnosti korekce práce.

Doporučuji, aby byla práce přijata k obhajobě podle §47 VŠ zákona 111/98 Sb.

V Hradci Králové, dne 14. července 2009


MUDr. Miloslav Šalavec, CSc.
Odborný asistent katedry dermatovenerologie
LF UK a Klinika nemocí kožních a pohlavních
FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové