



Posudek na dizertační práci MUDr. Nely Pilbauerové

“Vliv kryokonzervace na kmenové buňky“

Cílem dizertační práce bylo studovat vliv procesu kryokonzervace na viabilitu a diferenciační potenciál kmenových buněk izolovaných ze zubní dřevě. Jedná se o hodnotný a v kontextu dosavadních znalostí o přínosnou vědeckou studii. Dílčí parametry, konkrétně morfologie, proliferační aktivita, viabilita, fenotyp, relativní délka telomer a diferenciační potenciál celkem 10 izolovaných linií byly proměřeny, vyhodnoceny a vhodně komentovány v kontextu současného stavu vědění v dané problematice. Výsledky dizertační práce obvyklého rozsahu jsou podpořeny kvalitními publikačními výstupy, kde se studentka na jejich zpracování a prezentaci podílela významnou měrou a splnila tak beze zbytku veškerá kritéria požadovaná pro obhajobu dizertační práce na LF UK se sídlem v Hradci králové.

V teoretické části se studentka věnovala popisu vlastností kmenových buněk, principům kryokonzervace kmenových buněk s důrazem na kryokonzervaci kmenových buněk zubní dřevě a vhodné kryokonzervační protokoly. Práce je podpořena více jak 130 převážně recentními pracemi. Teoretická část je zpracována čtivě a přehledně. Zajímavé pasáže týkající se účinku DMSO a jeho toxicity (str. 6 – 9) bych ještě doplnila o detailnější informace týkající se metabolismu této látky a vlivu jak DMSO, tak i jeho metabolitů na viabilitu a diferenciační potenciál takto ošetřených kmenových buněk. Podobně bych uvítala více informací o samotném procesu rozmrazování, což považuji také za rozhodující fázi z pohledu viability a diferenciačního potenciálu zamrazovaných kmenových buněk.

Z rozsahu i zaměření experimentální části je zřejmé, že dizertantka musela zvládnout mnoho metod a izolačních i kulturačních postupů, přípravných preanalytických kroků a podpůrných analytických metod. Metody byly v kontextu definovaných cílů vhodně zvoleny a opíraly se o nejmodernější dostupné postupy. Velké množství naměřených a statisticky vyhodnocených dat je komentováno v rozsáhlé diskuzi a to vždy v kontextu s recentní

odbornou literaturou. Velice zajímavá a hodnotná se jeví část komentující výsledky imunofenotypizace v kontextu s diferenciačním potenciálem kmenových buněk (str. 62 – 63). Výsledky prošly recenzním řízením a jsou publikovány v odborných časopisech. Práce je po formální stránce dobře a pečlivě zpracována. Grafy, tabulky, obrázky jsou vyjádřeny jednotnou formou. Musím také ocenit, že autorka při prezentaci svých výsledků obrazovou formou beze zbytku dodržela pravidlo „samonosnosti“ obrázků a grafů; komentáře a způsob prezentace výsledků je téměř bezchybný. Pouze chci upozornit na duplicitu popisu výsledků týkající se imunofenotypizace – přehled uveden jak v textu, tak i v tabulce (str. 39 – 41, tab. č. 4). Výsledky práce jsou dokumentovány mikroskopickými záznamy kmenových buněk s indukovanou diferenciací (obr. 5 – 11). Zde bych jen upozornila na nejasnost týkající se faktického vyjádření „% plochy obrázku“. Výsledky jsou též doplněny o reprezentativní záznamy měření na průtokovém cytometru uvedené v příloze.

Vzhledem k obsahové kvalitě vlastní práce bych měla pouze několik, nikterak podstatných, formálních připomínek: i) seznam zkratk by měl být psán jednotnou formou, u zkratk pocházejících z anglických termínů je vhodné uvádět nejen český ekvivalent, ale i původní anglický název – a to důsledně v celém seznamu, ii) použití anglikanismů a jejich neobratné skloňování, které, jak se domnívám, bylo možné nahradit českými ekvivalenty (monolayer, population doubling time, bovinní), iii) chybné uvedení termínů fykoerytrin, RNA vázající motiv, fluorescein izothiokyanát, yttrito-hlinitý granát.

V další části hodnocení dizertační práce uvedu otázky a náměty k diskuzi.

- A) Na straně 8 dizertantka popisuje způsoby odstranění DMSO z buněčné suspenze po jejich rozmrazení. Vyzkoušela si dizertantka některé z nich a jaké metody by sama v praxi upřednostnila a proč?
- B) Velmi mne zaujala metody kryokonzervace kmenových buněk pomocí magnetického pole (str. 13). Jaké jsou konkrétní výsledky srovnání této metody s metodami v praxi běžně používanými? Může dizertantka definovat výhody a případné nevýhody této metody? Proč doposud tato metoda, kde lze minimalizovat množství „toxického“ DMSO, nenašla uplatnění v praxi?

- C) Do jaké míry považuje dizertantka výsledky o velikosti buněk měřených pomocí přístroje Z2 Counter za významné, jedná-li se primárně o vřetenovité buňky s četnými cytoplazmatickými výběžky?
- D) Na straně 58 dizertantka komentuje výsledek měření viability buněk po zamražení 6M u druhé pasáže, kde došlo k výraznému poklesu. Podobný efekt nebyl u buněk po 12 měsíčním zamražení pozorován. Dokonce, jak sama autorka uvádí, efekt byl zcela opačný. Domnívá se autorka, že důvody poklesu viability uvedené pro linie 6M již pro linie 12 M nepřicházely v úvahu?
- E) Dizertantka uvádí ve svém CV účast na projektu, kde se studovala možnost použití kyseliny hyaluronovou jako kryoprotektivum. Mohla by dizertantka komisi stručně informovat o jejím zapojení do projektu, jejích úkolech, a případně i o dílčích výsledcích, kterých bylo doposud dosaženo?

Závěrem bych chtěla konstatovat, že předložená práce dokladuje schopnost autorky úspěšně řešit složité vědecké problémy, využívat nejmodernější instrumentaci, tvůrčím způsobem zavádět nové metody, pracovní postupy. Autorka přehledně vyhodnotila a správně interpretovala získaná data, vše diskutovala v kontextu s odbornou literaturou. MUDr. Nela Pilbauerová dosáhla v rámci svého postgraduálního studia zajímavých a hodnotných výsledků, které nesporně obohatí znalosti specialistů z oboru stomatologie. Dizertantka splnila cíle vytčené v rámci dizertační práce.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji přijetí práce k obhajobě

V Pardubicích dne 25. srpna 2020

Prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Univerzita Pardubice, FCHT
Katedra biologických a biochemických věd