

POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI

Univerzita Karlova Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní obor: **Stomatologie**

Disertační práce: **Vliv kyseliny hyaluronové na kmenové buňky zubní dřeně**

Vypracoval: **MDDr. Jan Schmidt**

Vedoucí disertační práce: **doc. MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D.**

Zhodnocení významu disertace pro příslušný obor

Doktorská disertační práce řeší zajímavé i velmi aktuální téma týkající se poznatků kyseliny hyaluronové (KH) a kmenových buněk zubní dřeně (KBZD). Základem disertace jsou dva experimenty in vitro. První pilotní experiment ověřil předpoklad, že buňky v prostředí zvolených molekul adherují, přežívají, proliferují, zachovávají si svůj typický fenotyp a udržují si schopnost diferencovat osteogenním a chondrogenním směrem. Druhý testoval kyselinu hyaluronovou na 5 liniích kmenových buněk zubní dřeně s různými molekulami, které vznikají při in vivo degradaci kyseliny hyaluronové (800 Da, 1600 Da, 15 kDa), kdy byla zaznamenána akutní redukce proliferační aktivity v porovnání s kontrolní skupinou ($p = 0,0033$, $p = 0,0033$, $p = 0,1416$). Také kmenové buňky zubní dřeně kultivované v médiích s nízkomolekulární KH byly statisticky významně menší v porovnání s kontrolní skupinou ($p = 0,0078$, $p = 0,0019$, $p = 0,0098$). Všechny buňky si udržely vysokou expresi povrchových znaků typických pro kmenové buňky zubní dřeně (CD29, CD44, CD73, CD90). Buňky si i po dlouhodobé kultivaci v přítomnosti nízkomolekulární kyseliny hyaluronové udržely znaky mezenchymálních KB a naivní nediferencovaný fenotyp.

Vyjádření k postupu řešení problému, použitým metodám a splnění stanoveného cíle

Cílem práce bylo tedy zhodnotit vliv kyseliny hyaluronové na kmenové buňky izolované ze zubní dřeně ze stálých zubů s důrazem na nízkomolekulární kyselinu hyaluronovou. Vliv kyseliny hyaluronové byl komplexně analyzován z pohledu porovnání viability, velikosti, proliferační aktivity, fenotypu, diferenciačního potenciálu a telomerázové aktivity kmenových buněk zubní dřeně.

Vlastní materiál a metodika byla rozdělena několik částí. Studie využívala farmaceuticky čistou kyselinu hyaluronovou, která byla ověřena kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektroskopií. Vlastní odběry zubů byly provedeny za antiseptických podmínek a po použití dekontaminačního roztoku byly ponořeny do 10 % Hankova balancovaného solného roztoku. Potom byly přeneseny do laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie LF HK. Zde byla provedena izolace, mobilizace, expanze a kryokonzervace zubní dřeně.

Pro pilotní experiment i pro pokus s nízkomolekulární kyselinou hyaluronovou byly provedeny specifické kultivace buněk. Počet i velikost buněk byly stanoveny v každé pasáži. Proliferační aktivita byla vyjádřena populačním zdvojením. Analyzátor Vi-Cell stanovil viabilitu buněk a fenotyp byl analyzován metodou průtokové cytometrie na konci experimentů. Zvláštní pozornost byla věnována délce telomer buněk, posouzen byl i diferenciační potenciál.

Friedmanův a Dunnův post hoc test posuzovaly neparametrická data. Pro parametrická data byla provedena jednofaktorová ANOVA a Fischerův LSD post hoc test. Pro určení sféricity dat byl zvolen Mauchlyho test.

Stanovený rozsah prací byl splněn a následující výsledky vedly k novým poznatkům v oboru

Stanovisko k výsledkům disertační práce a k původnímu přínosu předkladatele disertační práce

Z literatury je známo, že kmenové buňky zubní dřene jsou dobře dostupnou populací adultních mezenchymálních kmenových buněk, které mají vysoké proliferační schopnosti a které se mohou diferencovat v odontoblasty, osteoblasty, chondroblasty, myoblasty, adipocyty, buňky produkující insulin či endoteliální a neurální buňky a tento potenciál je možné využít v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně.

Pilotní experiment prokázal nové poznatky, že kmenové buňky zubní dřene při dlouhodobé kultivaci v přítomnosti kyseliny hyaluronové o molekulárních hmotnostech 116 kDa, 540 kDa a 1500 kDa a koncentraci 0,1 % přežívají, adherují k povrchu, proliferují a udržují si schopnost diferencovat ve zralé buněčné elementy ve srovnatelné míře jako buňky kultivované v kontrolním médiu.

V další části experimentu bylo zjištěno, že u buněk nasazených do médií nebyl pozorován rozdíl v adherenci buněk k povrchu kultivační nádoby, ale byl zaznamenán statisticky významný pokles proliferační aktivity v experimentálních skupinách. Velikost buněk kultivovaných v experimentálních skupinách byl statisticky významně menší než velikost buněk v kontrolní skupině. Viabilita buněk nebyla přítomností kyseliny hyaluronové negativně ovlivněna. Výrazné rozdíly byly pozorovány ve fenotypu buněk, kde jeho celková analýza odhalila statisticky významné snížení exprese povrchových znaků v experimentálních skupinách. Buňky si i po dlouhodobé kultivaci v přítomnosti NM KH udržely znaky mezenchymálních KB a naivní nediferencovaný fenotyp.

Vyjádření k uspořádanosti, přehlednosti, formální úpravě a jazykové úrovni práce a publikacím studenta

Doktorská disertační práce MDDr. Jana Schmidta se skládá ze 7 kapitol, má 104 stran textu, 209 literárních citací, doplněných bohatou obrazovou dokumentací, grafy a tabulkami. Práce, jak již bylo uvedeno, má dvě části experimentální. Je správně formálně rozčleněna, psána spisovnou odbornou češtinou.

Z hlediska použité metodiky je možné konstatovat, že disertant využil nejmodernější technologické postupy včetně exaktního statistického vyhodnocení. V koncepci jednotlivých dílčích studií je zahrnuta řada vlastních cílených pozorování a závěrů.

Výsledky studie kvalitativně posunují hranice současných informací o znalosti kmenových buněk zubní dřeně. Dokladem jsou i 4 vědecké práce s IF včetně jednoho prvního autorství. Dizertační práce splnila stanovený cíl předkládaný disertantem.

Na disertanta nemám žádné dotazy.

Závěry

MDDr. Jan Schmidt uzavřel v disertaci výzkumnou práci, jejíž výsledky přináší nové poznatky, které mají přímý dopad budoucí praktické využití kmenových buněk zubní pulpy. Disertační práci hodnotím jako doklad o vysokém odborném profilu autora a projevené schopnosti vědecky pracovat.

Proto doporučuji předloženou disertační práci k obhajobě a udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Praze 29. července 2021

prof. MUDr. Taťjana Dostálová DrSc., MBA
Stomatologická klinika dětí a dospělých 2. LF UK a FN Motol
V úvalu 84, 15006 Praha 5