

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI

MDDr. Terezy Suchánkové Kleplové

Stomatologická klinika LF UK a FN v Hradci Králové

Dizertační práce:

Kultivace kmenových buněk zubní pulpy v kultivačním médiu bez xenogenních látek

Doktorský studijní program: Stomatologie

Studijní obor: Stomatologie

Školitel: MDDr. Nela Pilbauerová, Ph.D.

Školící pracoviště: Stomatologická klinika, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Rozsah práce a dokumentace

Předložená dizertační práce má celkem 104 stran včetně prohlášení autora, identifikačního záznamu, příloh, seznamů obrazové dokumentace i tabulek a 12 stránek citací odborné literatury. Z 282 uvedených zdrojů je 130 titulů z období posledních pěti let. Vysoký počet aktuální literatury je daný výjimečnou pozorností vědecké veřejnosti k tématu. Ze 13 původních prací je paní doktorka první autorkou dvakrát, jedenáctkrát je spoluautorkou a spoluautorkou je rovněž jednou kapitolou v monografii: Suchánek J, Brown KZ, Suchánková Kleplová T, Mazurová Y. Protocols for Dental-Related Stem Cells Isolation, Amplification and Differentiation in Zavan B, Bressan E. *Dental Stem Cells: Regenerative Potential*. Schwitzeland: Humana Press, 2016. 27-56. Z uvedených publikací je 8 v časopisech s IF. Studie je přiměřeně ilustrovaná kvalitními fotografiemi, přehlednými tabulkami, schématy i grafy.

Zpracování tématu s ohledem na dosavadní stav dané problematiky

Autorka se zaměřuje na výzkum kultivace kmenových buněk zubní dřeně (hDPSCs) v kultivačním médiu bez xenogenních komponent s cílem ozřejmit možnosti, které naplní základní podmínku pro buněčnou terapii a její zavedení do lékařské praxe. V klinické praxi totiž nelze používat buňky, které proliferovaly pod vlivem xenogenních (mimodruhových) látek. Nejrozšířenější xenogenní komponentou kultivačního média je fetální telecí/bovinní sérum. Tato xenogenní komponenta zásadně ovlivňuje vlastnosti kmenových buněk a není tak jisté, zda všechny doposud získané výsledky jsou validní a jaký dopad na samotné kmenové buňky bude mít vyřazení tohoto suplementu z kultivačních protokolů. Používané metody nejsou dostatečně spolehlivé, jednoduché, a proto se často kombinují. A právě nahrazení fetálního telecího séra deriváty lidské krve při kultivaci kmenových buněk izolovaných ze zubní dřeně stálých, dočasných a natálních zubů je aktuální problematikou a

může být velkým přínosem pro regenerativní medicínu i tkáňové inženýrství. Autorka v předložené práci ověřuje, zda je možné fetální telecí sérum nahradit derivátem lidské krve, konkrétně krevní plasmou a krevní plasmou bohatou na destičky, o různé koncentraci. Dále pak autorka studuje jaký vliv tato záměna má na kultivované kmenové buňky izolované ze zubní dřevě.

Struktura práce je standardní, zahrnuje souhrn, úvod, cíl práce, materiál, metodiku, výsledky, diskusi, závěr.

Úvod má několik pasáží, které jsou zaměřeny na obecné vlastnosti kmenových buněk a jejich rozdělení, detailněji se pak věnuje kmenovým buňkám izolovaným ze zubní dřevě zdůvodnění možného negativního vlivu fetálního telecího séra na kultivované buňky a možnosti náhrady fetálního telecího séra při kultivaci.

Cíle práce vycházejí z hypotéz, že deriváty lidské krve jsou možnou náhradou fetálního telecího séra při kultivaci kmenových buněk zubní dřevě a tyto buňky si zachovávají základní vlastnosti kmenových buněk. Krátká diskuse uvádí problematiku využití různých koncentrací derivátu lidské krve (2 %, 10 % a 20 %), jako možnosti náhrady fetálního telecího séra při kultivaci kmenových buněk zubní dřevě. Autorka zde formuluje soubor na sebe logicky navazujících hypotéz a v kapitole „Materiál a metodika“ předkládá detailně vypracované kroky k jejich potvrzení, či vyvrácení. Ať už se jedná o sběr biologického materiálu, jeho skladování, zpracování vzorků, popis, měření včetně popisu výsledků jednotlivých metod až po statistickou analýzu dat.

Výsledky

Měření základních biologických vlastností (proliferační aktivita, populační doubling time a analýza fenotypu) z celkem 12 linií kmenových buněk zubní dřevě (4x linie kmenových buněk zubní dřevě stálých zubů, 4x linie kmenových buněk zubní dřevě dočasných zubů a 4x linie kmenových buněk zubní dřevě natálních zubů), doložené grafickým znázorněním a popisem výstupů hodnotí a porovnávají vliv jednotlivých derivátů lidské krve v rozdílných koncentracích na vlastnosti kmenových buněk zubní dřevě s vlastnostmi stejných linií kmenových buněk zubní dřevě kultivovaných v mediu s obsahem fetálního telecího séra. Výstupy měření potvrzují původní hypotézu, že deriváty lidské krve jsou možnou náhradou fetálního telecího séra při kultivaci kmenových buněk zubní dřevě a tyto buňky si zachovávají základní vlastnosti kmenových buněk.

Diskuse

V kapitole „Diskuse“ autorka porovnává vhodnost použitých metod a postupů s výstupy prací zaměřených na obdobnou problematiku, které ovšem užívají jiných metodik a srovnává s nimi výsledky vlastních analýz. Vysvětluje možný vliv rozdílných postupů na výsledky experimentů a zmiňuje další faktory, které je mohou ovlivňovat. Zaměřuje se na problematiku jednotlivých metod, a vyslovuje možnou příčinu, proč při jejich vzájemném srovnání se v některých případech výsledky měření rozcházejí.

Kvalita docílených výsledků

Celkově lze charakterizovat dizertační práci **MDDr. Terezy Suchánkové Kleplové** jako významný příspěvek k poznání vlastností kmenových buněk izolovaných ze zubní dřene a zejména pak ke kultivačním protokolům. Celá koncepce práce směřuje k objektivizaci a k tomu účelu využívá nejnovějších dostupných metodik.

Stanovisko vycházející z předchozího rozboru a celkové hodnocení práce

Téma dizertační práce je bezpochyby aktuální a novými poznatky může významně přispět ke změně některých tradovaných přístupů při preklinickém studiu vlastností kmenových buněk.

K předložené práci mám několik, pro autorku spíše motivujících, poznámek:

1. *V práci se opakovaně vyskytuje jak pojem „zubní dřeň“, tak i pojem „zubní pulpa“- jednotné označení by bylo vhodnější s preferencí českého názvu „zubní dřeň“.*
2. *Str. 3. řádek 9. - diferenciační kapacitou- má být ...kapacity.*
3. *Str. 3. řádek 2.ospodu, autorka uvádí šířku f. apicis 2 mm – u zubu s dokončeným vývojem kořene je to spíše 0,2-0,35 mm*
4. *Str. 9. řádek 5. Nevhodně použitý výraz“ Díky“ s negativním výstupem diskutovaného- vhodnější by bylo nahradit jej „ Vzhledem“ nebo“Následkem“.*
5. *Str. 9. řádek 18. citace 166 je psána standardním fontem*
6. *Str. 11. řádek 13. ..Buňky jsem vystavily... jsme vystavili....*
7. *Str. 12. řádek 5. od spodu „Před dáním.... lépe -poskytnutím....*
8. *Str. 13. řádek 3. od spodu - Laboratorní pracovník používal při práci sterilních bariérových ochranných pomůcek – koncovky ... používal při práci sterilní bariérové ochranné pomůcky*
9. *Str. 14. řádek 4 – v závorce + text před tím má 2 x sloveso*
10. *Str. 14. řádek 21 a 22... za 90% vlhkost... a atmosféra...koncovka – vlhkosti...a atmosférou s 5%....*
11. *Str. 16. řádek 21....médiu obsahovalo bylo alfa MEM...médiu obsahovalo alfaMEM*
12. *Str. 16. řádek 22.6jamkových...6ti jamkových*
13. *Str. 17. řádek 5. ...rychle schlazeny –zchlazeny*
14. *Str. 21. řádek 5. spíše asi mělo být slovo „izotypové“ a ne „isotopové“*
15. *Str. 22. popis tabulek začíná nad tabulkou a končí pod tabulkou*
16. *Str. 30. řádek 3. -buňky zachyceny nazivně-nativně*

Autorce bych si dovolila položit následující otázky:

1. *Setkala jste se v průběhu experimentu s nějakým zásadním problémem, který bylo nutno vyřešit? Pokud ano, jaké bylo řešení?*
2. *V rámci literární rešerše jsem našla pouze málo publikací věnujících se linii kmenových buněk natálních/neonatálních zubů. Čím je toto podle Vás zapříčiněno?*

3. *Na straně 17 – z popisu verifikace adipodiferenciace vyplývá, že buňky byly před barvením pomocí olejové červeně zpracovány standardním histologickým postupem (ošetření pomocí alkoholové řady) – pokud tomu tak bylo, nedošlo k vyplavení tukových kapének?*

Závěr

MDDr. Tereza Suchánková Kleplová jednoznačně prokázala schopnost samostatné vědecké práce, logického myšlení i analýzy výsledků realizovaných experimentů. Téma předložené dizertační práce je aktuální a jeho zpracování zcela odpovídá požadavkům kladeným na postgraduální doktorské práce.

Doporučuji proto předloženou dizertační práci k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení navrhuji udělit **MDDr. Tereze Suchánkové Kleplové** akademický titul Ph.D.

V Praze dne 16.7.2023

doc. MUDr. Marie Bartoňová, CSc.