



Spectabilis

doc. Ing. Vladimír Bajzlík, Ph.D.
Děkan Fakulty textilní
Technická univerzita v Liberci
Studentská 1402/2
461 17 Liberec

prof. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar, Ph.D.
Ústav histologie a embryologie
Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova
Karlovarská 48
301 66 Plzeň
Tel.: +420607818614, +420377593320
E-mail: tonar@lfp.cuni.cz

Číslo jednací TUL – 21/4814/021445

Oponentní posudek

na dizertační práci paní **Mgr. Kateřiny Strnadové**, doktorandky v oboru Textilní technika a materiálové inženýrství, na téma „**Drawing: příprava scaffoldů pro regenerace nervové tkáně**“.

Doktorandka předložila anglicky psanou dizertační práci o 119 stranách, v níž zkoumá složení, přípravu, úpravy a uplatnění tkáňových nosičů založených na tažených vláknech.

a) Význam dizertační práce pro obor: Práce si klade za cíl vyvinout a optimalizovat vlastnosti tkáňového nosiče založeného na vhodném uspořádání tažených vláken tak, aby byl použitelný k překlenutí míšního defektu. Podpora růstu neuronů a jejich výběžků se zdá být velmi perspektivním směrem, který nastupuje po určitém vystřízlivění z nadějí vkládaných v minulosti do terapie poškození nervového systému pomocí kmenových buněk. Jde o práci mezioborovou v příkladném a nejlepším slova smyslu. V oboru textilní techniky a materiálového inženýrství přináší pokrok v přípravě a cílené úpravě nosičů. V oboru experimentální biologie nervové tkáně je přínosem překlenutí zcela zásadní mezery oddělující *in vitro* testy s *in vivo* implantací do zvířecího modelu. Jde o vysoce aktuální a potřebný výzkum cílící do oblasti, kde je nedostatek dobře podložených a interpretovatelných experimentálních studií.

b) Postup řešení problému a použité metody: Po historickém úvodu formuluje uchazečka výše zmíněné cíle. Poté mapuje současný stav poznání v podobě velmi čtivě a srozumitelně zpracované literární rešerše, v níž mapuje uplatnění tkáňového inženýrství u míšních poranění, typy tkáňových nosičů vhodné pro tyto účely, jejich materiálové složení, funkcionalizaci a měřitelné vlastnosti. Metodická část je psána velmi podrobně a styl podání protokolů prozrazuje značnou erudici uchazečky. Spektrum postupů plně pokrývá řetězec od výchozích chemikálií, přes technologii přípravy vláken tažením, uspořádání vláken, popis vláken nástroji obrazové analýzy, mechanické testování vláken, měření smáčivosti a vodivosti, až k *in vitro* testům, *in vivo* implantaci do míšní hemisekce, RNA izolaci, syntézu cDNA, qRT-PCR, imunohistochemii a



mikroskopické techniky. Vysoká metodická úroveň umožňuje opakovatelnost práce a podporuje validitu touto cestou získaných výsledků.

c) Splnění cílů práce: Z výsledkové části a ze závěrů vyplývá, že práce splnila cíle formulované v kapitole 1.

d) Výsledky dizertace, nové poznatky a přínos autorky: V kapitole 5 je formulováno celkem 13 zjištění, která jsou opodstatněna výsledky a diskuzí z kapitol 3-4. Spatřuji tyto hlavní přínosy práce:

- Popis vlivů koncentrace polymeru, molekulární hmotnost a rychlosti tažení na průměr vláken a na vznik porézních defektů v nich.
- Metodická upřesnění při měření mechanických vlastností a vodivosti.
- *In vitro* popis adheze, proliferace, orientace buněk a biokompatibility na orientovaných a potažených vláknech.
- Přípravu a *in vivo* otestování nového typu můstku pro překlenutí míšního defektu u myši s vyhodnocením růstu výběžků, apoptózy, imunotolerance a myelinizace.

Míru přímého podílu autorky nenacházím výslovně uvedenou a mohla by být upřesněna během vlastní obhajoby. Způsob, jakým je práce sepsána, však svědčí o významném zapojení do většiny činností. Doktorandka prokázala svoje znalosti při formulaci vědeckého problému na základě kritického rozboru současné úrovně vědeckého poznání. Prokázala schopnost plánovat, provést a vyhodnotit vhodně navržené experimenty v účelném uspořádání. Doktorandka je schopna vědecké práce se získáním konkrétních výstupů, je schopna výsledky kriticky interpretovat a z těchto výsledků vyvodit odpovídající závěry. Celou práci je schopna shrnout do srozumitelně psaného a logicky provázaného odborného sdělení. Autorka uplatnila v diskusi velmi vyváženou argumentaci a rovněž schopnost pojmenovat nově vyvstálé otázky a navrhnout jejich zodpovězení během další práce v jejím oboru. To vše považuji za součást vizitky zralého a samostatného vědeckého pracovníka.

e) Vyjádření k publikacím uchazečky: Součástí dizertace nejsou plné texty vlastních publikací, ani autorčina úplná bibliografie. Předpokládám doložení těchto informací před komisí pro obhajoby. Z veřejných zdrojů (Web of Science, ResearchGate) lze dohledat tři recenzované publikace, které spadají do tématu práce a kde je uchazečka spoluautorkou – ve všech případech jde o časopisy s vysokým rankingem (Polymers, Q1 dle JCR; dvakrát v Materials Letters, Q2). Dále je k dohledání spoluautorství publikace z jiného oblasti (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Q1).

f) Formální zpracování a jazyková úroveň: Práce je přehledně členěna, jednotlivé oddíly jsou dobře logicky provázány. Vysoce hodnotím srozumitelnost textu, práce se dobře čte. Fotodokumentace je vynikající a velmi informativně popsána. Grafická úprava je profesionální, nechybí seznamy ilustrací a poznámkový aparát. Překlepy se prakticky nevyskytují (str. 50 „permeabilizedin“). K formálnímu zpracování snad jen drobná doporučení:

- Obvyklé typografické konvence v angličtině nepoužívají mezeru mezi číselnou hodnotou a znakem %.
- V některých obrázcích a grafech zůstaly české desetinné čárky namísto v angličtině používaných teček (Fig. 4.3., 4.4).



g) Přípomínky a dotazy: Díky obsažnosti a mezioborovému přesahu práce je otázek, které se nabízejí, velmi mnoho a doktorandka si některých z nich sama všímá v kapitole věnované diskuzi. Kritické připomínky či výhrady nenacházím. K diskuzi při obhajobě si však dovolím položit uchazečce následující dotazy:

- Lze z dat Vašeho *in vivo* experimentu usoudit alespoň přibližně na rychlost regenerace nervových výběžků?
- V některých skupinách Vašeho experimentu je počet jedinců $n=4$ příliš nízký pro uplatnění konvenčních statistických testů, které většinou vyžadují $n \geq 6$. Vidíte v tom překážku pro publikaci výsledků?
- Jaké známky degradace jevila vlákna po 8 týdnech *in vivo*? Nebo byla zcela rozpuštěna při histologickém zpracování? Jaká je očekávaná životnost Vámi připravených vláken *in vivo*? Jaká je optimální životnost vláken pro hojení defektů nervového systému dříve, než degradují?
- Vámi připravované nosiče jsou vhodné k implantaci do poranění s ostrými konci (míšní hemisekce se ztrátou míšního segmentu). Můžete stručně diskutovat uplatnění u poranění s tupým pohmožděním nervových struktur?
- Vidíte nějaké rozdíly v přípravě nosičů pro překlenutí míšních defektů v porovnání s nosičem pro podporu hojení poranění periferních nervů?
- Jak sama uvádíte na str. 6, Schwannovy buňky obalují nervové výběžky, popř. tvoří myelin v periferním nervovém systému. V centrálním nervovém systému, kam patří i Vámi zkoumaná mícha, jsou obaly nervových vláken tvořeny výběžky astrocytů a myelin je tvořen oligodendrocyty. Proto působí překvapivě, když popisujete u Vašeho experimentu v míše „Schwann cell-derived myelin“? Schwannovy buňky se v míše samotné přirozeně nevyskytují, byť se někdy experimentálně transplantují při výzkumu léčby míšních lézí (to ale patrně nebyl případ Vašeho experimentu), popř. se vyskytují v míšních kořenech.
- Anatomická poznámka: Vaše práce se soustředí na podporu regenerace bílé hmoty míšní, tj. míšních drah/traktů. Ke způsobu hojení odstraněné šedé hmoty míšní se nevyjadřujete. Je ke zvážení toto zohlednit a nehovořit o regeneraci míchy jako celku.
- Experimentálním u výzkumu regenerace míšních lézí u zvířecího modelu se na vysoké úrovni věnují na Anatomickém ústavu MU v Brně (doc. Marek Joukal, práce např. Pubmed PMID 30927067, 29740961, 30778286). Vidíte nějaký potenciál spolupráce v možném testování Vašich tkáňových nosičů?

h) Závěr a doporučení: Z předložené práce vyplývá, že doktorandka prokázala schopnost samostatné a tvůrčí činnosti v oblasti výzkumu a vědecké práce. Dizertační práce splňuje požadavky kladené na doktorskou dizertaci zákonem č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění. Proto ve smyslu § 47 uvedeného zákona doporučuji komisi její přijetí v předložené podobě jako podklad k obhajobě. Za předpokladu úspěšné obhajoby doporučuji, aby paní Mgr. Kateřině Strnadové byl udělen akademický titul „doktor“ (Ph.D.) v příslušném oboru podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Plzni dne 26.7.2021


prof. MUDr. Mgr. Zbyněk Tonar. Ph.D.

**Oponentský posudek disertační práce Mgr. Kateřiny Strnadové
„Drawing: Fabrication of Scaffolds for Neural Tissue Engineering“**

Doktorská práce Mgr. Kateřiny Strnadové patří svým zaměřením do rychle se rozvíjejícího oboru tkáňové inženýrství. Zabývá se přípravou vhodných tkáňových náhrad využitelných zejména pro léčbu poškozených nervových tkání, kde organizace mezibuněčné hmoty má prioritní význam pro jejich funkčnost.

O zodpovědné přístupu disertantky k řešení problematice svědčí nejen přehledně zpravovaná literární část vycházející z dostupných recentních publikací, ale i rozsáhlá experimentální část, která pokrývá laboratorní přípravu cílových vláken a dále jejich úpravu a biologické testování

Vlastní práce je koncipována klasicky tj. bez kombinace textu s publikacemi disertantky, což je dle mého názoru časově náročnější, zato však pro hodnotitele přehlednější.

Úvodní kapitola má přiměřený počet stran, jak již bylo uvedeno, je přehledná a vychází z dosud publikovaných studií týkající se dané problematiky. Disertantka popisuje základy, metody a cíle tkáňového inženýrství s důrazem na léčební postupy nervových tkání. V seznamu literatury je uvedeno kolem 200 literárních zdrojů využitých jak v literárním úvodu, tak v metodice a diskuzi. Tento počet svědčí i tom, že Mgr. Strnadová věnovala náležitou pozornost jak teoretické přípravě, tak i experimentální části a jejímu vyhodnocení.

Experimentální část je poměrně rozsáhlá a jsou v ní uvedeny všechny relevantní informace o použitých chemikáliích, buňkách, přístrojovém vybavení a použitých metodických postupech. Pro přípravu vhodně orientovaných vláken využitelných pro vývoj tkáňových nervových náhrad, použila doktorandka nekomerční, méně často používanou drawing metodu (vlákno tažené z kapky). Navrhla a podílela se na konstrukci laboratorního přístroje a optimalizaci podmínek přípravy cílových vláken z roztoku polyméru, včetně měření namáhání připravených vláken v tahu, jejich vodivosti. Vláknová struktura byla po té funkcionalizovaná polypyrrolem zajišťujícím stabilitu připravené tkáňové struktury. Vedle *in vitro* měření byl sledován *in vivo* vývoj, konstrukce a charakterizace takto připraveného nosiče (scaffoldu) buněk.

Ve všech částech práce je text doplněn vhodnými obrázky, grafy a názornými fotografiemi pořízenými při hodnocení vzorků SEM.

Výsledky a diskuze jsou spojené do jedné části (35 stran), po níž následuje kapitola Závěry (4 str.), která přehledně sumarizuje významné výsledky. I když já sama preferuji ve vědeckých pojednáních výsledky oddělené od diskuze, musím konstatovat, že v tomto případě je toto spojení plně funkční. Troufám si zařadit disertaci Mgr. Strnadové mezi nejlepší práce z těch, co jsem kdy hodnotila.

Pokud mohu posoudit, práce je psána v anglickém jazyce velmi dobré úrovně. Po formální stránce jsem našla pouze několik málo překlepů a v literatuře např. dvakrát citovaný článek samotné disertantky. Naopak jsem velmi ocenila barevně odlišené údaje roku vydání publikace, které umožňuje rychlou orientaci v použité literatuře v textu. K vlastní odborné práci nemám žádné konkrétní připomínky, ale mám dva příspěvky do diskuze.

V tab. 2.5 a 2.6 jsou uvedeny konduktivní polymery a jejich charakteristika. Proč pro vlastní práci disertantka vybrala právě polypyrrol? Na základě vlastních zkušeností či z literárních údajů?

Dle uvedených výsledků v disertační práci lze usoudit, že vyvinutý postup přípravy tkáňových náhrad má perspektivní využití. Zajímalo by mě, zda bude práce na této problematice pokračovat a jaká je perspektiva zavedení navržených postupů do léčebných procesů.

Při závěrečném hodnocení doktorské disertační práce Mgr. Strnadové bych ráda poukázala i na její aktivní publikační činnost. Ve WOS jsou uvedeny čtyři impaktované publikace (3xQ1, 1xQ2). V jedné z nich je disertantka první autorkou, a u ostatních spoluautorkou. Výsledky byly též prezentovány na vědeckých setkáních, což také svědčí o jejich aktuálnosti v oboru. Disertantka jednoznačně prokázala schopnost vědecky pracovat a dosažené výsledky zpracovat do publikovatelné formy. Na závěr svého posudku konstatuji, že se Mgr. Kateřina Strnadové zhostila svého úkolu s velkým nasazením a jsem přesvědčena o tom, že její disertační práce splňuje veškeré požadavky vyplývající z § 27, odst. 4, zákona č.111/1998 Sb. O vysokých školách, a proto ji doporučuji přijmout k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.

V Praze dne 24.8. 2021.

Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.