

Oponentní posudek disertační práce

Název práce:	Cell Mechanics
Autorka práce:	Ing. Katarína Mendová Fakulta strojní, České vysoké učení technické v Praze
Studijní program:	Strojní inženýrství
Studijní obor:	Biomechanika
Školitelka:	prof. RNDr. Matej Daniel, Ph.D. Fakulta strojní, České vysoké učení technické v Praze
Oponent:	doc. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D. Fakulta strojní, České vysoké učení technické v Praze

I. Shrnutí významu a aktuálnosti tématu práce

Disertační práce Ing. Kataríny Mendové se zabývá experimentálním testováním a matematickým popisem mechanického chování liposomů vytvořených pomocí mikrofluidního zařízení. Dva typy liposomů jsou v práci využity jako modely buněk. Autorka v práci navrhuje konstitutivní matematické modely buněčné indentace, ve kterých využívá popis kapalného pláště biomembrány liposomů. Jedním z důležitých aspektů práce je zhodnocení vlivu způsobu mechanického zkoušení a také zpracování experimentálních dat. Autorka v práci dále diskutuje současné přístupy k modelování mechanického chování buněk, zejména v literatuře často používaný Hertzův model. Mechanické vlastnosti buněk hrají zásadní roli pro jejich funkce, růst, dělení, pohyb nebo adhezi. Experimentální vyšetřování mechanických charakteristik jednotlivých buněk je velmi aktuální téma, které vyvolává velký zájem nejen v základním výzkumu, ale také v některých průmyslových odvětvích vzhledem k jejich významu například v diagnostice nemocí a imunity, ve vývoji léčiv nebo při separaci buněk.

II. Posouzení zvolené metodiky a provedení výzkumu

Cílem předložené disertační práce je vytvořit model, který by sloužil jako standard pro hodnocení mechanických charakteristik jednotlivé buňky a bylo by jej možné využít pro verifikaci současných přístupů využívaných pro mechanické zkoušení buněk. Jasnou motivací je chybějící srovnání těchto přístupů, jejichž výsledky, opakovatelnost a míra zobecnění jsou zásadně ovlivněny samotnými principy jednotlivých metod, ale také rozdíly, které souvisí zejména s typem použitých buněčných kultur, fázemi buněčného cyklu nebo podmínkami experimentů. Z předložené práce je zřejmý autorčin vhlad do této problematiky. Mimo jiné jej dokládá volba využití dvou odlišných typů liposomů (vyplněných fosfátovým pufrům nebo kyselinou hyaluronovou) jako uměle vytvořených buněk s jasně definovanými a především opakovatelnými vlastnostmi, zvolené experimentální metody jejich testování (AFM, nanoindentace), vhodně využitý matematický aparát (zejména precizní modely biologické membrány) a v neposlední řadě i statistické metody aplikované pro vyhodnocení získaných dat a interpretaci výsledků.

III. Posouzení výsledků a jejich interpretace

Disertantka pro svou práci navrhla a vytvořila mikrofluidní zařízení, které dále použila pro efektivní přípravu dvou typů liposomů, které posloužily jako model buněk. Její přístup hodnotím velmi kladně, jednak zohledňuje standardizaci a opakovatelnost zkušebních vzorků, které jsou zásadní pro verifikaci zvolených experimentálních a analytických postupů, a především její práce představuje komplexní přístup k experimentální práci. Mezi hlavní výsledky disertační práce patří podrobné ověření dvou metod mechanického zkoušení buněk, posouzení jejich opakovatelnosti a kritické zhodnocení zdrojů variability výsledků. Disertantka dále zavedla matematické modely a diskutovala jejich vhodnost s ohledem na omezení stávajících přístupů k modelování mechanické odezvy buněk, zvláště pak upozorňuje na omezení v základních předpokladech klasického Hertzova modelu. Pro interpretaci výsledků využila vhodných statistických postupů. Dosažené poznatky představují slibné výsledky využitelné pro experimentální modely živých buněk s komplexní vnitřní strukturou. Skvělé jsou i publikační výsledky autorky. Ty představují tři prvoautorské články (dva z nich jsou v recenzi) a jeden spoluautorský článek v prestižních odborných časopisech, kapitolu v knize (Elsevier) a celou řadu konferenčních příspěvků vztahujících se k práci nebo vypracovaných na jiná témata. Seznam vlastních prací je doplněn o šest výzkumných zpráv a tři funkční vzorky.

IV. Hodnocení formální stránky práce

Předložená disertační práce má výbornou formální a jazykovou úroveň, její členění je systematické, obsahuje všechny náležitosti jako seznamy použitých symbolů a zkratk, ilustrací, tabulek, použité literatury i vlastních publikací. Všechny použité zdroje jsou v práci správně ocitovány. Autorka se v práci opírá o úctyhodných 156 cizích i vlastních publikací. Práci se nedá mnoho vytknout, přesto si dovoluji jen pár drobných poznámek. Použité statistické metody jsou vhodně zvolené a smysluplně aplikované, přesto v některých částech je interpretace výsledků použitých testů trochu neobratná, například rozdíl „na hraně statistické významnosti“ (p 0,02, str. 71) je jinde (0,018, str. 68) již statisticky významný. Riziko spojené s rozhodováním o nulové hypotéze je sice o 0,2% vyšší, ale o skutečném rozdílu mezi středními hodnotami nic nevyovídá, neplatí tvrzení, že čím nižší je p hodnota, tím je výsledek důležitější nebo kvalitnější. Domnívám se, že při rozhodování o statistických hypotézách je vhodné držet se zavedeného kritéria. V případě rozptýlených dat by bylo vhodné zkusit interpretovat například důvod sešikmení nebo více vrcholů jejich rozdělení. To by mohlo do interpretace výsledků přinést jiný vzhled, podobně jako zaměření se na věcný efekt a testování hypotéz upozadit. A ještě v poslední poznámka, v uvedených grafech jsem si nezvykl na označení „empty“ použité pro liposomy vyplněné PBS.

V. Otázky oponenta

1. V práci se detailně věnujete a diskutujete vliv adheze liposomů a buněk k povrchu. Pokud by Vámi navržená metodika byla použita pro reálné buňky, očekávala byste rozdílné charakteristiky způsobené různou mírou jejich adheze k povrchu např. vlivem doby kultivace? Je možné oddělit tento mechanismus od jiných fyziologických procesů (buněčné dělení, migrace), které mohou mít na mechanické vlastnosti vliv?
2. Jako model buňky (a její buněčné membrány) jste si vybrala liposom. Skutečná buněčná membrána obsahuje proteiny, lipidy, na povrchu integrované polysacharidy. Existuje možnost, jak modelový liposom modifikovat i tímto směrem, a tím blíže simulovat mechanické vlastnosti skutečné buněčné membrány?
3. V práci uvádíte reprezentativní hodnoty mechanických vlastností vybraných komponent buňky (str. 35), bez uvedení jejího typu. Mohla byste, prosím, stručně okomentovat, jestli jsou popsány rozdíly v mechanických charakteristikách různých typu buněk (např. buňky epitelu a buňky vaziva) buněčných typů? A lze očekávat také změny v mechanických vlastnostech komponent například vlivem buněčné fáze (např. při dokončení dělení a začátku indukce apoptózy) nebo vlivem stáří buňky a ním souvisejícím vyšším obsahem tukových složek, např. cholesterolu?
4. V práci vysvětľujete význam mechanických vlastností buněk pro včasnou detekci rakoviny. Jde spíše opět o zvědavost oponenta, ale je podle Vašeho názoru možné očekávat rozdílné mechanické vlastnosti buněk, například buněk epitelu při přechodu do metastáze, kdy se z ní stává buňka mezenchymová a ztrácí mezibuněčné spoje, a totožných buněk epitelu v různých fázích svého fyziologického cyklu?

VI. Závěrečné shrnutí

Závěrem konstatuji, že předložená **disertační práce splnila stanovené cíle a vykazuje znaky kvalitní vědecké práce**. Předloženou **disertační práci doporučuji k obhajobě** a po jejím úspěšném provedení, udělení titulu doktor vyznačovaného zkratkou Ph.D. užívanou za jménem tak, jak stanoví Zákon č. 111/1998 Sb.

V Praze 10. 6. 2024

doc. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky
Fakulta strojní, České vysoké učení technické v Praze