

Posudek na disertační práci MDDr. Ily Michalus s názvem:

Vývoj a implementace nových přístupů umožňujících proteomickou charakterizaci kostních tkání ve stomatochirurgii

Disertační práce stojí na proteomických experimentech, ve kterých byly použity vzorky čelistních kostí. Hmotnostní spektrometrií byly analyzovány vzorky peptidů získané trypsinovým štěpením přímo v kosti. Na základě výsledků matematického zpracování hmotnostních spekter peptidů bylo možné ukázat, jak se případný patologický stav odráží v proteinovém složení. Nabízí se tak alternativa k běžnému histologickému vyšetření. Práce je obhajována v doktorském studijním programu Biochemie a patobiochemie na 1. lékařské fakultě UK, školitelem byl prof. Dr. Ing. Radovan Hynek.

Práce má obvyklé formální členění a v textu se většinou dobře orientuje. V úvodu se popisuje význam stomatochirurgie, vysvětluje opodstatnění léčebných chirurgických zákroků. Popisuje se příprava vzorku pro histologické vyšetření zahrnující dekalifikaci, fixaci a přípravu řezů pro mikroskopii plus techniky barvení. Zmíněny jsou moderní přístupy k zákrokům, jako jsou vysokofrekvenční vrtačky a lasery, tomografie, řízené postupy regenerace tkání. Další kapitola se zabývá proteomikou jako vědní disciplínou. Stručně podává historii oboru, cíle a používané experimentální techniky s důrazem na hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF a LC-MS/MS. Popisuje se spojení kapilární elektroforézy s UV detekcí jako alternativa k hmotnostně spektrometrické analýze peptidů. Nechybí ani informace o využití proteomiky ve stomatologii např. analýzy ústní tekutiny, periodontálního ligamenta a zubní dřevě, ale i tvrdých tkání (alveolární kost, cement). Následující část je věnována využití trypsinu pro přímé štěpení proteinů v nerozpustných materiálech, tedy gelech, omítkách, zvířecích chlupcích či kostech a *in vitro* kostních modelech (osteoblasty, osteoklasty). V poslední části je uveden seznam významných proteinů, které byly v provedených experimentech prokázány v kostní tkáni.

Autorka uvádí cíle disertační práce, formuluje ověřované hypotézy a popisuje svoji roli v autorských týmech. Výsledková část představuje komentáře k přílohovým publikacím. Tyto vyšly v mezinárodních vědeckých časopisech International Journal of Mass Spectrometry, Electrophoresis, Journal of Separation Science (2×). MDDr. Michalusová je ve třech případech prvním autorem a jednou sdíleným prvním autorem. Článek v International Journal of Mass Spectrometry popisuje využití trypsinu pro štěpení přímo v kostech („in bone digestion“) a jeho optimalizaci. Článek v Electrophoresis se věnuje charakterizaci odoperovaných lidských čelistních kostních tkání, podařilo se identifikovat cca 1000 proteinů. Použití isopropanolu v předřazeném kroku před vlastním štěpením vedlo ke zvýšení počtu identifikací. Rozlišení mezi vzorky zdravých a zánětlivých kostí díky metodě PLS-DA zpracování dat dosáhl 73 %, když nebyl použit preinkubační krok. Při zařazení preinkubačního kroku s isopropanolem se přesnost vzájemného rozlišení obou skupin (zdravé tkáň versus zánětlivá tkáň) zvýšila na 100 %. První článek v Journal of Separation Science popisuje charakterizaci indukovaných patologických stavů v modelech lidských kostních tkání, ve vzorcích *in vitro* modelů lidských kostních tkání byly indukovány patologické stavy (rakovina, záněť). Proteiny byly štěpeny přímo ve vzorku bez extrakce, identifikováno bylo cca 500 proteinů. Vůči kontrolám bylo možné patologické stavy rozlišit (PLS-DA), stejně tak šlo rozlišit tyto stavy vzájemně. Další článek v Journal of Separation Science se věnuje monitorování digestů pomocí kapilární elektroforézy a detekci možného zánětu při čelistní chirurgii. Elektroferogramy peptidů byly zpracovány PCA analýzou, bylo možné odlišit modelové vzorky po štěpení trypsinem nebo chymotrypsinem, čelistní a lýtkové kosti. Díky PCA zpracování získaných dat bylo možné vzorky zdravých lidských čelistních tkání spolehlivě rozlišit od tkání postižených zánětem.

Výsledky jsou řádně diskutovány. Autorka hodnotí vývoj techniky pro štěpení proteinů přímo v kostech bez nutnosti zahrnout krok mineralizace. Vycházelo se z předpokladu, že porézní charakter kostí umožní dostatečnou difúzi trypsinu k proteinům a po jejich štěpení snadnou difúzi peptidů do roztoku. Rozpustné proteiny v kostech byly chápány jako kontaminace a proto byl zařazen promývací krok, v tomto se osvědčila aplikace isopropanol. Shrnuje se použití vypracované techniky pro analýzu odoperovaných čelistních kostí, promytí s isopropanolem umožnilo následně vysoce přesné rozlišení vzorků zdravých a patologických tkání. Diskutuje se rychlost používané strategie ve srovnání se zavedenými postupy. Přístup se štěpením přímo v kosti byl též úspěšně využit pro charakterizaci in vitro modelů lidských kostních tkání s indukovanými patologickými stavy. Pomocí LC-MS/MS byla identifikována řada proteinů. Matematická analýza umožnila rozlišit mezi indukovanou rakovinou a kontrolou, indukovaným zánětem a kontrolou. Rozlišit bylo možné oba zmíněné patologické stavy vzájemně. Spojení kapilární elektroforézy s UV detektorem bylo odzkoušeno jako úspěšná alternativa LC-MS/MS analýz peptidů z kostních vzorků podrobených proteolytickému štěpení proteinů. Rozlišení zdravých a zánětlivých vzorků na základě porovnání peptidových elektroferogramů a jejich matematického zpracování PCA bylo možné i přes malé rozdíly v peptidových profilech. Výhodou této techniky je větší dostupnost a nižší náklady na analýzy, než je tomu v případě hmotnostní spektrometrie.

Závěr shrnuje zjištěné skutečnosti, tedy že proteomické analýzy kostních tkání ve stomatochirurgii, které jsou založeny na přímém štěpení, mají potenciál přinést do problematiky pohled na molekulové úrovni. To by mohlo vést k lepšímu pochopení fyziologických a patologických procesů v kostech.

Mohu konstatovat, že autorka prokázala vědecké tvůrčí schopnosti, tedy umění pracovat s odbornou literaturou, samostatně plánovat a provádět laboratorní experimenty, a to včetně jejich vyhodnocení a diskutování. Osvědčila se rovněž jako členka vědeckého týmu. Nedílnou součástí celku disertační práce je publikační aktivita. To vše vnímám jako doklad profesní zralosti v oboru. Můj posudek proto končí doporučením disertační práce k obhajobě před odbornou komisí a jako součásti řízení o udělení doktorského titulu.

Komentáře a dotazy:

- Proč byl pro promývací krok při „in-bone“ štěpení proteinu zvolen zrovna isopropanol a ne jiné rozpouštědlo mísitelné s vodou (methanol, ethanol, aceton atd.)? Šlo o optimalizaci, nebo to byl výsledek šťastného a fungujícího nápadu?
- Anglická slova, např. názvy metod – „peptide mass fingerprinting“, by v českém textu měla být v uvozovkách
- Str. 13, o genomu se hovoří jako o statickém souboru genů. Je opravdu genom neměnný?
- Str. 15; v teorii LC-MS/MS chybí jakákoli informace o používaných ionizačních technikách (elektrosprej, APCI, ...) a dnes převážně používaném nanoprůtokovém uspořádání chromatografu, přestože např. ionizační technika MALDI je vysvětlena. V přehledu by mohlo být komentováno při obhajobě.
- Str. 16; databáze aminokyselinových sekvencí proteinů používané pro prohledávání MS dat nemusí vycházet jenom z DNA sekvencí. Mohou být zastoupeny i výsledky z *de novo* sekvenčních analýz proteinů a peptidů.

V Olomouci dne 10. 11. 2023



Prof. Marek Šebela