

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Marka Svobody  
**„Adaptation of conventional and modern non-invasive methods for analysis  
of photoaged human skin barrier“**

Disertační práci Mgr. Marka Svobody tvoří 121 stran textu včetně 29 obrázků a 5 tabulek. Vlastní výsledky jsou zevrubně popsány v příslušných úsecích disertační práce. Práce má obvyklé členění, text podává přehled o těsném spojení z pohledu bariérové funkce pokožky, o vhodných modelech a metodikách pro studium řešené problematiky, vymezuje cíle disertační práce, materiál a metodiku, získané výsledky; disertace je doplněna diskusí a literárními citacemi a zakončena shrnutím závěrů. Po obsahové stránce je práce zaměřena na optimalizaci metod a na vlastní studium vybraných složek kožní bariéry s využitím široké škály přístupů.

V úvodu autor poskytuje informace o stavbě a bariérové funkci lidské pokožky a pozornost věnuje zejména bariérovým lipidům a těsnému spojení ve *stratum corneum*. Dále popisuje různé modely vhodné ke studiu kůže, způsobu odebírání reprezentativních vzorků a jejich zpracování. Rozsáhlá část se pak zaměřuje na metodickou stránku analýzy lipidů, kožní bariéry a možnosti analýzy *t. junctions*.

Část „materiál a metody“ čítá celkem 11 stran textu a zahrnuje optimalizaci metodických přístupů, odběr vzorků včetně postupů jejich analýzy. Samostatný oddíl pak shrnuje a popisuje řadu rozmanitých postupů, které byly použity při analýze těsných spojení a bariérových funkcí epidermis včetně chemických, molekulárních a mikroskopických přístupů.

Výsledky vlastní disertační práce jsou shrnuty do tří částí. První část se věnuje optimalizaci metodik, zejména podmínek pro extrakci proteinů, pro imunohistochemickou detekci vybraných komponent těsných mezibuněčných spojení a průkazu lipidů v pokožce prasete. Druhá část byla zaměřena na charakteristiku výtěžnosti odběru vzorků epidermis šetrnými metodami uměle vytvořeného puchýře (*suction blistering*) a pomocí adhezivní pásky (*tape-stripping*) v návaznosti na následné analýzy. Poslední část výsledků se zaměřila na kožní bariéru a analýzu *t. junctions* u pokožky exponované slunci a chráněné před slunečním zářením, a to u dvou odlišných věkových skupin. Analýza prokázala změny ve složení a pokles lipidů v kůži exponované záření, přičemž bariérové vlastnosti se příliš nemění. Nálezy potvrdily klíčovou participaci okludinu a těsnících spojení na udržení hodnot transepidermální ztráty vody (TEWL) v kůži s narušenou skladbou lipidů.

V diskusi doktorand dále rozebírá technické aspekty provedených analýz a nálezy z vlastních experimentů s literárně dostupnými daty. Nejvýznamnější závěry jsou samostatně komentovány v závěrečném souhrnu; z jejich obsahu jednoznačně vyplývá, že všechny stanovené cíle disertační práce byly splněny.

Práce Mgr. Marka Svobody je napsána pěknou a srozumitelnou angličtinou. Literární citace jsou nejslabším místem předložené práce. Jednotlivé reference jsou uváděny s odchylkami: i) Názvy většiny článků jsou psány malými písmeny (s výjimkou počátečního písmene), nicméně některé názvy obsahují velké písmeno na začátku slov (s výjimkou předložek), ii) zkrácené názvy časopisů ukončují tečky, ale občas jsou uváděny bez nich. iii) některé zkratky nejsou standardní, např. *Ski. Res. Technol.* (který doktorand cituje opakovaně) neznačí Lyžařskou výzkumnou technologii, ale *Skin Res. Technol.* Největší výtku bych pak měl vůči zanedbatelnému počtu literárních citací z posledních 5 let. Z 276 citovaných prací jich z posledních 5 let pochází jen 19 (včetně autocitací), tj. méně než 7%! Studenti doktorského studijního programu jako budoucí experti musí aktivně sledovat a znát recentní práce vztahující se k problematice, jíž se věnují! Při čtení jsem opravdu místy propadal dojmů, že text byl napsán před řadou let. Naštěstí vlastní řešení používalo velmi moderních přístupů, získané výsledky byly věrohodně doloženy a precizně zpracovány, což rozptýlilo mé pochybnosti o autorovi této disertační práce.

Největší předností předložené práce jsou původní nálezy rozšiřující poznatky o zastoupení lipidů a proteinů *tight junctions* v návaznosti na udržení transepidermální ztráty vody v kůži mladých a starších jedinců. Popsané výsledky jsou průkazně dokumentovány mikrofotografiemi a grafy. Z pohledu přínosu pro rozvoj vědního oboru se jedná o zcela původní nálezy. Z výsledků práce jednoznačně vyplývá, že všechny stanovené cíle disertační práce byly splněny.

Souhrnně soudím, že Mgr. Marek Svoboda svou disertační prací prokázal předpoklady pro samostatnou tvořivou vědeckou práci. Doktorand doložil praktické zkušenosti s odběrem kožních vzorků a jejich zpracováním, s analytickými i mikroskopovacími metodami, a kultivací tkáně. Prokázal též pečlivost a trpělivost nezbytnou pro vyhodnocování nálezů a přípravě nálezů k publikaci. Řešená problematika je zcela původní a doplňuje nové poznatky o bariérové funkci kůže ovlivněné stárnutím. Souhrnně soudím, že předložená práce svým charakterem i rozsahem odpovídá požadavkům kladeným na doktorskou disertaci. Proto vřele doporučuji, aby se stala základem pro její obhajobu a aby byl Mgr. Markovi Svobodovi podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb. udělen akademický titul Ph.D.

prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.  
Ústav histologie a embryologie  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

V Hradci Králové, dne 22. 9. 2020