

POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Dynamická kultivace buněk na titanových maticích

Ing. Jana Štěpanovská

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE,

Fakulta biomedicínského inženýrství

Doktorský studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Školitel: prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D, MBA

Oponent: prof. MUDr. Pavel Kučera, Ph.D., FCMA

1. Aktuálnost disertační práce

Možnost využití anorganických materiálů jako náhrad biologických tkání je stále předmětem intenzivního výzkumu a technologického vývoje. Rozsáhlé klinické aplikace dosáhl zejména obor kostních a kloubních náhrad a implantátů užívaných v oblastech traumatologie, ortopedické chirurgie a stomatologie. Pokroky v těchto oblastech dovolují výrazně zlepšit kvalitu života, hlavně u rostoucí populace vyššího věku.

Jedním z problémů kostních náhrad je úprava jejich povrchu způsobem umožňujícím optimální asimilaci materiálu kostí příjemce. Práce Ing. Štěpanovské je tedy rozhodně aktuální, a to nejen z hlediska možnosti praktického využití výsledků, ale také z hlediska výzkumu fyziologických procesů, kterými kostní buňka po celý svůj život reaguje na mechanickou zátěž.

Práce je koncipována na základě důkladné literární rešerše (182 relevantních citací).

2. Splnění cílů disertační práce

Práce splňuje vymezené cíle a přináší odpovědi na formulované otázky:

- byl zkonstruován systém dovolující kultivaci a diferenciaci buněk pod mechanickou zátěží a také za různých metabolických podmínek;
- ze šesti povrchových úprav titanového materiálu byl definován povrch nejlépe stimulující kolonizaci a diferenciaci užitých buněk ke kostnímu fenotypu;

- bylo prokázáno, že aplikace intermitentní mechanické zátěže v tomto systému signifikantně podporuje osteogenní diferenciaci užitých buněk.

3. Metody a postupy řešení

- Důmyslné navržení a konstrukce systému pro simultánní statickou i dynamickou kultivaci mnohočetných vzorků buněk vyžadující znalosti mechaniky, elektroniky a automatizace.
- Metody kultivace: získání biologického materiálu, izolace, a *in vitro* pěstování buněk.
- Logický postup strukturální i funkční charakterizace kultivovaných buněk moderními metodami + komplexní multifaktoriální analýza (9 buněčných parametrů, 6 různých úprav titanového povrchu, dvou- a trojrozměrné prostředí, 2 koncentrace gelu, 3 časové intervaly).

4. Výsledky disertační práce a konkrétní přínosy disertant

Práce přináší:

- Fungující prototyp automatizovaného systému kultivace buněk za definovaných fyzikálně – chemických podmínek. Navržený systém dovoluje simulovat fyziologické podmínky působící na buňky. Originalita tohoto systému spočívá v možnosti simultánního testování velkého počtu vzorků, což dovoluje nejen ekonomii časovou ale i snížení počtu užitých pokusných zvířat. Jde o systém zatím jedinečný.
- Definici vhodné povrchové úpravy Ti6Al4V slitiny stimulující kolonizaci a osteogenní diferenciaci kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně. Tento výsledek upřesňuje publikované informace. Metoda dovoluje testovat i jiné materiály a buněčné typy.
- Potvrzení, že mechanické namáhání kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně významně podporuje jejich osteogenní diferenciaci. Tento výsledek doplňuje a podporuje obecně přijaté teorie.
- Velmi zajímavý výsledek: užití buňky vysazené do fibrinového gelu – trojrozměrného podpůrného prostředí – a podrobené intermitentnímu tlaku se nejen diferencují směrem kostního fenotypu, ale také se orientují ve směru tlakového namáhání.

5. Význam pro praxi a rozvoj studijního oboru Biomedicínská a klinická technika

Práce nabízí možnosti pro další výzkum:

- aplikovaný: Automatizovaný systém vyvinutý v této práci dovoluje *rychlé a ekonomické testování buněčné adaptace u vyvíjených materiálu* určených pro tkáňové náhrady.
- základní: Dynamická kultivace, spolu s užitím třídimensionálních podpůrných gelových struktur zlepšuje možnosti *studovat buněčnou transdukcí mechanických podnětů, mechanismy osteogenní diferenciacce a kostní metalaxie* (prostorová remodelace kosti vzhledem k orientaci mechanického namáhání). Na vysvětlení těchto jevů se stále čeká.

6. Formální úprava disertační práce a její jazyková úroveň

Komplexní problematika práce vyžaduje soustředěnou pozornost čtenáře. Text je ale velmi dobře a srozumitelně organizován, dovoluje dobrou orientaci a svědčí o bohatém slovníku a výborné znalosti pravidel českého jazyka.

Ilustrující dokumenty jsou vhodně zvoleny a velmi dobré kvality; grafy a tabulky jsou přehledně upraveny.

V textu bych uvítal:

- měřítko u nákresech konstrukcí;
- počty hodnocených vzorků (N) přímo v grafech (je třeba je hledat v textu);
- referenci pro výrok na str. 84, §2: „...Buňky však fibrinový gel metabolizují a přetvářejí ho na vlastní ECM“.

7. Připomínky a závěrečné hodnocení disertační práce

Práce shrnuje výsledky z inženýrských i biomedicinských metodologických oblastí, přináší novou techniku testování materiálů pro tkáňové náhrady a otevírá zajímavé možnosti dalšího výzkumu. Velká část této práce a 3 další články ve spolupráci byly rovněž publikovány v časopisech s IF. Text uvádí také tituly 8 užitečných vzorů, kde kandidátka je spoluautorem.

Práce ukazuje, že autorka je schopná samostatně řešit komplexní výzkumnou problematiku, navazovat rovněž účinnou teamovou spolupráci a svoje výsledky publikovat.

Připomínky a otázky pro obhajobu:

1) Z obrázku 13A a ze statistické matrice 13A (str.102) je patrné, že proliferace buněk osmého dne je na povrchu AND a na povrchu BR prakticky stejná a zhruba 1,4krát vyšší oproti třetímu dni na skle (GL). V tabulce 4 je hodnota pro AND vsutku 1.42, ale pro BR jen 0.81, což zhoršuje jinak velmi dobré hodnocení tohoto povrchu. Prosím o vysvětlení.

2) Buňka, pokud není v suspenzi musí adherovat k pevnému substrátu. Na plochém povrchu s anizotropní úpravou nemůže být adheze než souhlasně polarizovaná, jak to vykazují buňky na kartáčovaném titanu (obr.14). V gelovém prostředí je ale polymerizace, a tedy prostorová orientace vláken fibrinu *a priori* homogenní. Že se v něm buňky orientují (obr. 23 a 24), může znamenat:

- a) tlakem je modifikována samotná struktura gelu a buňky adherují k vláknům gelu, která lépe odolala mechanickým deformacím;
- b) buňky jsou vsutku mechanosenzitivní a adherují v trojrozměrné struktuře k vláknům gelu jež jsou orientovaná ve směru mechanických sil: tedy skutečná fyziologická odpověď.

Můžete uvést argumenty pro vyloučení možnosti a)?

Závěr:

Považuji práci Ing. Štěpanovské za splňující podmínky kladené na disertační tézi a doporučuji, aby byla přijata k obhajobě.

V Lausanne, 24. října 2020.

Prof. Pavel Kučera

Université de Lausanne

Ecole Polytechnique de Lausanne

FBMI ČVUT Kladno

pkucera@unil.ch