



UNIVERZITA KARLOVA
I. lékařská fakulta

Oponentský posudek na disertační práci:

Ing. Jana Štěpanovská

„Dynamická kultivace kmenových buněk na titanových maticích“

Předmětem disertační práce byla dynamická kultivace kmenových buněk na titanových substrátech s mechanickým namáháním stimulující buňky k osteogenezi. Cílem práce pak byla kolonizace modelového titanového substrátu preosteoblasty za působení fyzikálních podmínek podobných fyziologickým, což z hlediska získaných výsledků může přispět k osteointegraci kostních implantátů a zvýšení biokompatibility.

Předložená práce je logicky členěna na kapitoly dle jednotlivých výsledků práce. Po krátkém úvodu autorka v první kapitole popisuje možnosti léčby traumatických poškození kostí se zaměřením na implantáty z Ti6Al4V. Následuje krátká kapitola o povrchových modifikacích titanových implantátů popsaných v přehledné tabulce, přičemž autorka se zde odkazuje na vlastní publikovaný článek. Dále se rešerše zaměřuje na možnosti zvýšení biokompatibility implantátů osazením povrchu buňkami pacienta a jejich kultivací v bioreaktorech. V závěru kapitoly pak navazuje popisem osteogenní diferenciaci kmenových buněk za působení tlakového namáhání a uvádí metody, které se pro tyto účely využívají, včetně parametrů, jež byly aplikovány v dalších studiích.

Cíle práce jsou definovány v logické návaznosti na předchozí rozbor řešení problematiky. Ing. Štěpanovská si stanovila jako hlavní cíl kolonizovat titanový povrch kmenovými buňkami, přičemž pro tyto účely měla navrhnout dynamický kultivační systém, jež bude simulovat fyziologické podmínky při vývoji osteoblastů (amplituda a průběh tlaku, doba namáhání), a otestovat Ti6Al4V substráty s různými povrchovými úpravami. Autorka si současně staví tři hypotézy, které vycházejí z jejího dosavadního praktického sledování i z literárních zdrojů. V souladu s uvedenými cíli je práce členěna na několik kapitol vždy s dílčí diskuzí a závěrem.

Třetí kapitola je věnována stavbě systému pro tlakové zatěžování buněk a konstrukci kultivačních komor pro tyto účely. Tento systém byl vyvinut za účelem udržování fyziologických podmínek pro buněčnou diferenciaci, kdy autorka uvádí, že podobný komerční systém není dostupný. Systém je velmi variabilní, co se týká možnosti nastavení parametrů, je tak vhodný pro experimentální účely, kdy je nutné často měnit podmínky kultivace. Velký potenciál má přepínací systém, díky kterému je možné nejen řídit dobu dynamické kultivace, ale také lze kultivovat paralelně několik vzorků za různých podmínek. Oceňuji, že systém je automatický a významně přispívá k vytvoření množství kvalitních výsledků, jak dokládají další studie autorky. Veškerá technická řešení jsou publikována ve čtyřech užitečných vzorech autorky, z nichž u dvou má majoritní podíl.

Další kapitola se zabývá stanovením povrchových parametrů substrátů z Ti6Al4V s různou povrchovou úpravou a jejich vlivem na osteogenní diferenciaci. Tato kapitola je součástí prvoautorského článku Ing. Štěpanovské. Autorka porovnává vliv povrchových vlastností – drsnosti a smáčivosti – matic s nejběžněji používanými povrchovými úpravami kovů (používané jak pro implantáty, tak pro pomocné nosné konstrukce u náhrad) – leštění, tryskáním, kartáčováním, anodizací a pokrytí uhlíkem podobným diamantu. Tyto hodnoty pak koreluje s jednotlivými analýzami buněčné proliferace a diferenciaci. Kapitola je doplněna množstvím grafů i obrázků. Autorka jasně uvádí zjištěné výsledky, kdy buněčná proliferace nepřímo koreluje s drsností povrchů, a naopak drsnost přímo koreluje s osteogenní diferenciací, což je v souladu s jinými publikovanými experimenty.

Poslední hlavní kapitola pojednává o samotné diferenciaci na testovaných maticích, kdy autorka využila hydrogely pro přirozený vývoj buněk. Jako velmi přínosnou hodnotím analýzu orientace buněk v gelech, kdy buňky v tuhém gelu se orientují podobně jako maturující osteoblasty, jak je znázorněno na 3D

projekci z konfokální mikroskopie. Navíc je patrný vliv dynamické kultivace, jak dokládají četné grafy i obrázky. Tuto kapitulu autorka plánuje uveřejnit v impaktované publikaci, což se jí zatím nejspíš přes množství dat ke zpracování nepodařilo.

Autorka Ing. Jana Štěpanovská všechny kapitoly shrnula v diskuzi, kde stručně popsala výsledky analýz, přínos práce a možné další využití navrženého systému, kdy dynamická kultivace s působením vnějších podnětů simuluje prostředí organismu a umožňuje tak testování a vývoj náhrad s redukcí počtu animálních experimentů, což je téma velice aktuální. Celosvětovým trendem je minimalizace animálních experimentů a jejich náhrada pomocí *in vitro* modelů v kombinaci právě s dynamickými kultivačními systémy.

Zpracování textu i příloh je velice přehledné a pečlivé. Věty jsou formulovány srozumitelně a na dobré jazykové úrovni. Po formální stránce je předložená dizertační práce v pořádku.

V předložené práci je citováno 182 původních prací mající vztah ke zpracované tématice, přičemž další desítky zdrojů se nachází ve člancích autorky. Citované publikace, převážně zahraniční, jsou zaměřené jak na biologická, tak i technická témata. Většina prací je aktuálních, tj. publikovaných za posledních deset let. Odkazy na literaturu jsou řádně zpracovány.

Vysoce hodnotím multidisciplinární přístup studentky k řešení problematiky, kdy rozsah realizačních prací pokrýval jak medicínu a biologii, tak i technický návrh zařízení. Návrhu i realizace experimentů v dizertační práci se autorka zhostila metodicky správně, od návrhu zařízení přes testování povrchů až po samotnou dynamickou kultivaci. Kladně hodnotím velké množství zpracovaných dat, které tvořily dostatečně velký soubor pro statistické vyhodnocení a dosahovaly tak vysokých hodnot hladiny významnosti. Závěry práce mohou sloužit jako východisko pro další výzkum vedoucí až ke klinickým testům navržené metody.

Pozitivně lze hodnotit i fakt, že práce vznikla ve spolupráci s několika institucemi a realizace byla podpořena několika granty, z čehož je patrné, že práce nevznikla samoúčelně a je v současném poznání aktuální. Autorka v rámci dizertační práce vytvořila tři články v impaktovaném časopise, z nichž u dvou je první autor, čtyři užité vzory a dva příspěvky na konferenci, což svědčí o vysoké úrovni práce a její aktuálnosti. Dále je spoluautorkou dalších impaktovaných článků, kapitol v knihách a dalších výstupů. Autorka tak značně převyšuje běžné nároky kladené na publikační činnost doktoranda.

Otázky k diskuzi:

- 1) Volila byste pro kolonizaci modifikovaných substrátů na bázi titanových slitin autologní nebo alogenní buňky? Má použití alogenních buněk výhodu oproti autologním buňkám?
- 2) Zvažovala jste pro dynamickou kultivaci i jiný typ namáhání, např. smykové napětí nebo elektrické pole?

Disertační práce Ing. Jany Štěpanovské splňuje požadavky, které jsou na takovou práci kladeny. Autorka prokázala tvůrčí schopnost a předpoklady pro samostatnou vědeckou práci.

Předloženou práci doporučuji k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby poté doporučuji udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

V Praze dne 3.11.2020

prof. RNDr. MUDr. Jiří Beneš CSc.