Vážený pan
Prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.
Předseda OR studijního programu
Lékařská biofyzika
Děkanát 3. LF UK
Ruská 87
Praha 10

Praha, 21.10.2020

Oponentský posudek k disertační práci Ing Romana Matějky na téma: " Autonomní systém pro udržení biofyzikálních podmínek potřebných pro kultivaci biologických kultur in vitro"

Dopisem předsedy oborové rady studijního programu Lékařská biofyzika, pana prof. MUDr., RNDr. Jiřího Beneše, CSc., ze dne 11.září 2020 jsem byl jmenován oponentem výše zmíněné práce ing. Romana Matějky. Oponenturu jsem přijal a vypracoval následující posudek:

Předložená disertační práce je psána přehlednou spisovnou češtinou. Práce obsahuje celkem 223 stránek, z toho je 77 vlastní práce, z nichž 14 stran zaujímá část práce s citacemi a popisy obrázků. Citace nejsou číslované, jsou řazené abecedně. Většina z nich jsou citace soudobé. Autor též správně cituje i práce značně starší, například z 60.let minulého století, které jsou však v cévní chirurgii, zvláště té experimentální, stále aktuální. Zbytek disertační práce (stránky 77 – 223) zaujímají soupis a kopie vlastních publikací, užitných vzorů a kapitol v knihách.
V úvodu práce jsou uvedeny přehledně zkratky, které autor v textu používá. Text práce obsahuje (zvláště její začátek) některé gramatické a stylistické chyby, včetně překlepů. Namátkou str 5., abstrakt: „..ovšem v pro náhradu..", str. 19: "..špatní mechanické vlastnosti". Str.25: „tento systému..", obr 6: „komor pro tkáň), atd..
Práce je smysluplně členěna, obsahuje 5 kapitol, které jsou logicky uspořádané.

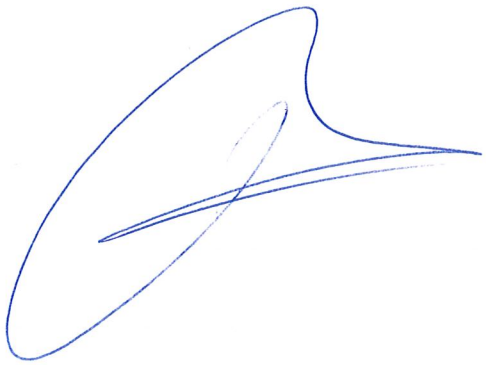
Úvodní část seznamuje s problematikou okluzivních arteriálních chorob. Autor poukazuje na malé možnosti cévních náhrad a na nutnost vývoje buněčných náhrad pomocí tkáňového inženýrství.
Po úvodní části autor shrnuje anatomické základy, stavbu cévní stěny, dále endotel, jeho diferenciaci a vliv smykového napětí. Autor popisuje diferenciaci buněk hladkého svalstva. Přehledně popisuje různé dynamické systémy pro buňky endotelu a hladkého svalstva.
Autor si jako cíle své práce vybral jednak decelularizaci tkání a jejich přípravu pro rekolonizaci s vývojem unikátního automatického systému. Dalším dílčím cílem byla stimulace endotelových buněk smykovým napětím a stimulace buněk hladkého svalstva hydrostatickým tlakem v in-vitro podmínkách. Tyto metody autor zužitkovává v přípravě implantabilních kardiovaskulárních náhrad v bioreaktoru, opět in vitro. Pátým, posledním cílem je použití připravených náhrad v pilotním testování na animálním modelu in-vivo.
Metodická část práce je dobře popsána. Autor popisuje v úvodu vznik celé řady kultivačních komor a systémů. Toto autorovi umožnilo výrobu automatizovanému systému pro decelularizaci zvířecích planárních a tubulárních tkání. Jednotlivé etapy decelularizace (rozklad, enzymatické štěpení, oplach) probíhají automatizovaně v cyklech. Opakovanými pokusy na prasečích a ovčích perikardech byl optimalizován přesný decalularizační protokol. Obdobný, na míru upravený protokol byl vytvořen též pro prasečí cévy – karotidy.

Pro stimulaci endotelových buněk autor využívá osvědčený systém planparalelních desek s úzkou průtočnou štěrbinou. Autor používá endotelové buňky z vena saphena. Celý systém byl optimalizovaný v buněčném inkubátoru se zapojením mikroskopu pro možnost živého sledování buněk. Autor tím úspěšně dokumentuje orientaci buněk v proudění a vazbu mezibuněčných kontaktů po 72 hodinách dynamické kultivace. Autor popisuje též vlastní kultivační systém pro osazení decelularizovaných prasečích krkavic a syntetických tubulárních náhrad. Technická řešení jsou popsána v užitných vzorech.
Vedle smykového napětí autor popisuje v metodologické části práci vznik komory pro tlakovou stimulaci planárních vzorků, ale též mikroperfůzní systém s tlakovou stimulací za účelem jednak perfuze kultivačním mediem, ale též zajištění stimulace buněk pulsními tlakovými vlnami. K ovládání systému autor vytvořil vlastní software.
Jako výsledky nutno hodnotit též části, popsané v metodologii. Jedná se o vývoj celé řady systémů pro kultivaci a stimulaci buněk, též o výběr správných protokolů.
Autor na bohaté obrazové dokumentaci dokumentuje jednotlivé výsledky. Decelularizace je ověřena histologickými kryořezy na začátku, dále po použití jednotlivých činidel s výslednou tkání bez zbytků jader a DNA.
Co se týče výsledků podpory endotelizace a smykového napětí: autor verifikuje rozdíl kultivace ve statických i dynamických podmínkách, včetně použití kombinovaných povrchů. Kombinované povrchy verifikuje jako vhodnější pro modifikaci umělých cévních náhrad z důvodu interakce buněk a materiálu.
Tlakové zatížení dle výsledků autora mělo vliv na proliferaci lidských kmenových buněk po 3 dnech. Výsledky byly oproti statické kontrole významné 7. den (použito imunofluorescenční barvení alfa-aktinu a kalponinu). Obrazová dokumentace též ukazuje významně lepší adhezi a růst mezenchymálních kmenových buněk prasete na nanocelulozových substrátech.
V testování recelularizace decelularizovaných tkání pro přípravu implantabilních cévních náhrad v kultivačním bioreaktoru autoři zjistili, že buňky při dynamické kultivaci pronikly téměř celou tkání po 10 dnech kultivace. Zavedením rekolonizace z obou stran došlo ke snížení doby homogenní rekolonizace na 5 dní. Opět verifikováno na histologických řezech.
Výše uvedené postupy autor využil pro in-vivo použití připravených autologně osídlených kardiovaskulárních záplat na praseti. Vlastní pilotní pokus spočívá v odběru tuku, izolaci buněk, nasazení na decelularizovanou tkáň, dynamickou kultivaci a implantaci do uměle vzniklého defektu v a.carotis prasete. Zvíře bylo měsíc sledováno, následně provedena explantace náhrady. Imunohistologická analýza ukazuje v případě rekolonizované decelularizované cévy formaci endotelových buněk.

Předkládaná práce je velmi zajímavá - má nejen experimentální dopad, ale hlavně se zabývá možným řešením problematiky nedostatku cévních štěpů v klinických oborech cévní a kardiovaskulární chirurgie.
Experimentální část musela znamenat velkou časovou náročnost a též manuální zručnost. Svoji strukturou je práce zajímavá, ačkoli se použití velkého množství různých kultivačních a stimulačních systémů může zdát složité a je nutné poměrně hluboké studování práce a jejich výsledků pro pochopení dílčích závěrů. Jako málo rozvinutou vidím část práce v experimentu in-vivo na praseti. Chybí zde popis metodiky a jednotlivých výsledků.
V experimentu práce naplnila své cíle jednak vytvořením decelularizovaných tkání a jejich přípravu pro rekolonizaci s vývojem unikátního automatického systému, dále v přípravě implantabilních kardiovaskulárních náhrad v bioreaktoru s úspěšnou a verifikovanou stimulací jednotlivých druhů buněk.

Jednoznačně se domnívám, že práce splnila podmínky dizertační práce a navrhuji, aby po úspěšné obhajobě byl ing. Romanovi Matějkovi udělen titul Ph.D.

K autorovi mám následující dotazy:

1. Zda autor sledoval viabilitu buněk po rekolonizaci na cévní náhradě v závislosti na čase?
2. Jaká byla časová náročnost v pilotním projektu na experimentálním zvířeti od odebrání tukové tkáně po implantaci připraveného cévního štěpu – tzn časová doba mezi fází 1 a 5? Kolik bylo použito zvířat a s jakou mortalitou, resp. úspěšností?
3. Autor nepíše, zda cévní štěpy na praseti byly po 1 měsíci průchodné či nikoli. Prosím o doplnění této skutečnosti a o příslušný komentář.

MUDr. Tomáš Pantoflíček, Ph.D., FESSR
Klinika Transplantační Chirurgie IKEM, Praha