

<b>Oponentský posudek:</b>	<b>Disertační práce</b>
Titul:	Hyaluronan v chondrogenezi mezenchymálních kmenových buněk
Autor:	Mgr. Jana Dvořáková
Instituce:	Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta

### Téma práce

Poranění kloubní chrupavky se stává jednou z dominantních kapitol ortopedické operativy, jak vyplývá z řady vědeckých publikací a odborných setkání. Pro úspěšnou léčbu je zapotřebí mj. vhodného chondrogenního štěpu. Posuzovaná práce se zabývá metodikou přípravy štěpu, který je založen na nosiči (skefoldu) na bázi hyaluronanu v kombinaci s mezenchymálními kmenovými buňkami. Dokumentuje sled kroků, které provázejí biologickou část vývoje chondrograftu od počátečních, převážně metodických experimentů, po vlastní testování kvality štěpu v podmínkách in-vitro.

Úvodní komentář podává ucelený a velmi dobře srozumitelný obecný přehled o současném stavu poznání problematiky regenerace/reparace kloubní chrupavky, o zdrojích a povaze mezenchymálních kmenových buněk a průběhu rané chondrogenní diferenciaci. Na základě těchto poznatků autorka shrnuje soubor požadavků kladených na materiály použitelné v chondrogenních štěpech a podmínkách jejich přípravy. Tyto požadavky jsou pak vztaženy na materiály připravené na bázi hyaluronanu s přihlédnutím k normální funkci hyaluronanu v kloubní chrupavce.

Těžiště práce spočívá v souboru čtyř publikací a jednoho rukopisu připraveného k publikaci (viz dále), jejichž zaměření kopírují vymezené cíle. Práce jako celek je prováděna jasnou snahou o získání prakticky uplatnitelných poznatků nejen v úvodních metodických studiích, ale také v interpretaci experimentů zabývajících se rolí nativního i derivovaného hyaluronanu v průběhu chondrogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk. Vysvětlování podstaty a mechanismů biologických procesů nepatří ke stěžejním bodům práce, je proto umístěno mírně do pozadí probírané problematiky. Slouží především k interpretaci získaných výsledků ve vztahu k potenciálním aplikacím, což patří z hlediska obsahu práce k tomu nejdůležitějšímu.

V kontextu současného stavu poznání a vývoje dané problematiky je zvolené téma vysoce aktuální. Problematika přípravy skefoldových materiálů pro reparaci chrupavky zaznamenala v posledních cca dvaceti letech mohutný rozmach. Současné klinické postupy jsou zaměřeny především na využití chondrocytů, přičemž se potýkají s celou řadou nevýhod, které s tím souvisejí. Aplikace mezenchymálních kmenových buněk se zdá být výhodným řešením těchto situací, z tohoto pohledu je nutno považovat jejich další výzkum za velmi perspektivní a přínosný.

### Rozsah práce a metoda zpracování

Jádrem práce je komentovaný soubor čtyř publikací a jednoho manuskriptu, tč. připraveného k publikaci. Tři práce jsou založeny na původních výsledcích, tyto byly přijaty k publikaci v recenzovaných mezinárodních časopisech s impakt faktorem (IF) v rozmezí 1,35 – 1,55. Jedna práce je rešeršní povahy, byla publikovaná v monografii věnované biopolymerům. Závěrečná studie je podána ve formě rukopisu připraveného k publikaci v odborném časopise. Souhrnný IF korigovaný na počet autorů dosahuje hodnoty 1,51, čímž splňuje požadavek oborové rady na kumulovaný souhrnný IF > 1,0. Autorka je uvedena na prvních místech mezi autory dvou z těchto publikací. Předložený rukopis je také prvoautorský.

Práce je zpracovaná přehledně, srozumitelnou angličtinou bez formálních chyb. Předkládané publikace jsou komentářem propojeny do logického celku a jsou zasazeny do kontextu světového stavu poznání dané problematiky. Citované práce jsou relevantní, přičemž obsahují i velmi recentní publikace.

### Výsledky

Práce je strukturována podle předložených publikací. Po úvodní rešerši věnované derivátům hyaluronanu následují dvě metodické práce.

První z těchto studií přináší porovnání tří metod stanovení buněčné viability. Ačkoli tato práce mezenchymální kmenové buňky přímo nevyužívá, vysvětlující komentář dostatečně osvětluje relevanci zjištěných výsledků pro tento buněčný typ.

Druhá metodická práce řeší problematiku získávání buněčného materiálu pro pokusné účely. Navrhuje a optimalizuje jednoduchou a velmi dobře přijatelnou metodiku izolace mezenchymálních kmenových buněk z odpadního materiálu zbývajícího po odběru kostní dřeně pro transplantační účely.

Metody ověřené v těchto studiích jsou dále využity v experimentech zaměřených na přímé působení hyaluronanu v chondrogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk. Nejprve je sledován účinek nativního hyaluronanu rozpuštěného v kultivačním mediu na chondrogenzi ve standardním peletovém modelu. Na základních markerech diferenciačního procesu je molekulárně biologickými a histologickými metodami dokázáno, že efekt hyaluronanu je minimální.

Poslední práce se pak zabývá efektivitou chondrogenze mezenchymálních kmenových buněk v hydrogelu připraveném z hyaluronanu v modelu odpovídajícímu přímo přípravě štěpu pro potenciální klinické aplikace. Analýza tohoto procesu je provedena sadou vzájemně komplementárních metod a ukazuje jeho uspokojujivý průběh. Práce je doplněna porovnáním diferenciačního procesu za různých podmínek. Demonstruje, že zdánlivá podpora chondrogenze může skrývat nebezpečí nežádoucích vedlejších účinků.

V celkovém vyznění výsledky obsažené v této dizertační práci poskytují dostatečné a relevantní podklady potřebné pro vývoj chondrogenního graftu. Tyto poznatky umožňují navrhnout další směr vývoje takového přípravku a také připravit úvodní testování na úrovni *in-vivo*. Vytyčených cílů celé práce tím bylo dosaženo.

## Závěr

Oponovaná práce dokládá schopnost autorky úspěšně řešit složité vědecké problémy, využívat k tomu moderní metody a přístupy, výsledky vhodnou formou jak interpretovat, tak prezentovat.

Práce splňuje v plném rozsahu požadavky kladené na dizertační práci a lze ji doporučit k závěrečné obhajobě.

### Otázky oponenta

V části 3.3 se autorka zabývá hledáním a optimalizací metody vhodné pro získávání MSCs. Zvažovala autorka pro využití i jiné zdroje MSCs (např. tukovou tkáň)? Jaké? Jaký byl hlavní důvod k utilizaci použitých transplantačních vaků?

V části 3.5. se autorka zabývá diferenciací MSCs na chondrocyty ve skefoldu na bázi tyraminem síťovaného hyaluronanu. Výsledky jsou jistě zajímavé, avšak pravděpodobně by více vynikly ve srovnání s jiným 3D kultivačním systémem. Jaký výsledek by autorka očekávala při experimentálním srovnání testovaného gelu s obdobným systémem?

V Praze, dne 2.4.2010

Doc. MUDr. Milan Handl, Ph.D.

Ortopedická klinika 2. LF UK, FN Motol  
V Úvalu 84  
150 18 Praha 5