

Oponentní posudek na disertační práci Mgr. Martina Plencnera: Nanovláknenné nosiče pro regeneraci incisionální kýly

Doktorand předložil disertační práci o 138 stranách, v níž se zabývá kompozitními nosiči z polypropylenové sítě a poly-ε-kaprolaktonových (PCL) nanovláken a jejich histologickým a mechanickým testováním. Tyto nosiče představují dle autora práce materiál vhodný pro nápravu kýly břišní stěny vzniklých v oblastech pooperačních jizev a pro prevenci vzniku kýly. Práce je členěna do 6 základních kapitol následovaných shrnutím hlavních poznatků práce v anglickém a českém jazyce a seznamem 246 citovaných literárních pramenů. Práce dále obsahuje seznam použitých zkratk, 6 tabulek, 38 vyobrazení a soupis autorových vlastních publikací vztahujících se k danému tématu.

Aktuálnost tématu disertační práce: Incisionální kýla představuje nejčastější pooperační komplikaci především u pacientů s velkými jizvami. Incisionální kýla postihuje až 20% pacientů po operaci ve střední části břicha. Původní jednoduché sešití zranění nebo stříhů tkání bylo nahrazeno dnes již standardně používanými protézními syntetickými sítěmi, které se začleňují do poraněné tkáně, kde podporují hojení tkáně a zvyšují její pevnost. Podpurné sítě musí zajistit bezproblémové léčení tkáně, přilnavost buněk, jejich proliferaci, migraci a diferenciaci. Je tedy nutné zajistit vhodnou porozitu sítěk simulující strukturu mezibuněčné hmoty, jejich chemickou inertnost a biokompatibilitu. Sítě nesmí být karcinogenní, nesmí způsobovat zanícení nebo alergickou reakci tkáně a musí být schopny odolávat mechanické fyziologické zátěži léčené tkáně. V současné době existuje celá řada sítěk na podporu incisionálních kýl, ale vývoj nových vhodných kompozitních sítěk je již řadu let výzvou pro tkáňové inženýrství. Téma práce považují proto za vhodně zvolené a jednoznačně aktuální.

Postup řešení problému: Uchazeč formuloval v druhé kapitole práce čtyři hlavní cíle práce:

1. Příprava a testování nového kompozitního nosiče tvořeného polypropylenovou sítí potaženou PCL nanovláknem s uchycenými krevními destičkami „in vitro“.
2. Testování kompozitního nosiče tvořeného polypropylenovou sítí potaženou PCL nanovláknem s uchycenými syntetickými růstovými faktory „in vivo“ na králíčcích jako modelu malých zvířat.
3. Testování nosiče tvořeného PCL nanovláknem s uchycenými krevními destičkami „in vivo“ na miniprasatech jako modelu velkých zvířat.
4. Testování nosiče tvořeného kryomletím PCL nanovláken jako možného nosiče léčiv „in vitro“.

Vytyčené úkoly ukazují, že se jedná o velmi rozsáhlou práci zaměřenou na náhrady na bázi PCL nanovláken. Po vysvětlení motivace práce v úvodu následuje ucelený a velmi dobře zpracovaný přehled klasifikace typů kýl, hlavních příčin a oblastí vzniku incisionální kýly, umístění protézních sítí, druhů syntetických i přírodních sítí, faktorů, které musí sítě splňovat a možných komplikací spojených s použitím sítí. Velmi přehledně je zde také popsána výroba jemných nanovláken a nanovláken typu jádro-plášť pomocí elektrostatického zvláknění a využití krevních destiček v tkáňovém inženýrství. V kapitole třetí popisuje uchazeč metodiku výroby

nosičů a mikročastic kryomletím, zakomponování růstových faktorů a krevních destiček do kompozitních nosičů, analýzu metabolické aktivity, životnosti a proliferace buněk, chirurgické začlenění nosičů do porušené tkáně králíků a miniprasat a následné mechanické a strukturní testování spojů. Čtvrtá kapitola popisuje velmi rozsáhlé výsledky studie. Zde si velmi cením zopakování informací o metodách, které byly pro vyhodnocení použity, ve zkrácené formě, přehledných grafů a obrázků s výsledky. V páté kapitole jsou diskutovány hlavní výsledky práce především zlepšení zkoumaných vlastností vlivem PCL nanovláken. Následující šestá kapitola shrnuje hlavní poznatky. Volbu metod i tento postup jako celek považuji za zcela logický a adekvátní formulovaným cílům. Ve čtvrté kapitole uchazeč kromě ukázky výsledků samotných už některé výsledky diskutuje, proto bych možná dala přednost spojení čtvrté a páté kapitoly.

Přínos doktoranda: Doktorand prokázal svoje hluboké znalosti v oblasti formulace vědeckého problému z oblasti tkáňového inženýrství, medicíny a mechaniky na základě kritického rozboru současné úrovně vědeckého poznání. Prokázal dále schopnost plánovat, provést a vyhodnotit vhodně navržený experiment v dosti netriviálním uspořádání a vyvodit odpovídající závěry. Vlastní přínos doktoranda je tedy zřejmý jak v oblasti rešeršní, tak v oblasti provedených a vyhodnocených experimentů.

Splnění cílů práce: Jak vyplývá především z kapitol 4 a 5, dizertační práce jednoznačně splnila formulované cíle.

Význam pro praxi a rozvoj vědního oboru: Práce ukázala, že PCL nanovlákná mají své využití, kromě v již dříve zkoumané regeneraci chrupavek, kostí, vaziva, šlach a nervového systému, i v reparativní chirurgii. Práce je tedy dle mého názoru vysoce přínosná v oblasti tkáňového inženýrství a chirurgických zákroků, kde může použití polypropylenových nosičů obohacených o PCL nanovlákná a krevní destičky nebo umělé růstové faktory značně zlepšit hojení tkáně a zabránit nebo minimálně oddálit vznik incisionální kýly. Systém mikročastic vzniklých kryomletím PCL nanovláken by mohl být v budoucnu díky postupnému uvolňování růstových faktorů vhodným na dodávání léčiv do tkání.

Formální zpracování a jazyková úroveň: Práce je logicky, systematicky a přehledně členěna, grafické zpracování je na vysoké úrovni, text je dobře čitelný, popisky obrázků jsou samovysvětlující. Práce je psána srozumitelnou a věcně správnou angličtinou obvyklou pro vědecká sdělení, množství jazykových nepřesností je zanedbatelné a z hlediska vlastní práce nepodstatné.

Připomínky a dotazy:

V kapitole 3.2.3 by bylo vhodné u informací o operaci uvést, kdy byly aplikovány nosiče. Dále pak jakým způsobem se odebíraly vzorky na biomechanická měření, aby byla zajištěna rovnoměrná šířka vzorků.

V kapitolách 3.2.4 a 4.2.2 by bylo vhodné použít konvenční značení mechanických veličin. Místo „elasticity in traction“ použít „elasticity in tension (Young’s modulus in tension)“; „maximum strength force“ nahradit „ultimate tensile strength“ nebo „maximum stress“; „proportional elongation value“ nahradit „maximal deformation“. Odpovídalo by to více i uvedeným

jednotkám. Síla má jednotku N, napětí Pa; prodloužení má jednotku mm, deformace je bezrozměrná. Rovněž by bylo vhodné uvést, jak byly výsledné hodnoty získány. U mezních stavů je možné zkoumat buď maximální naměřené napětí, nebo napětí, při kterém došlo ke vzniku trhliny. Jejich hodnoty nemusí být totožné. U modulu elasticity se zpravidla uvádí, z jaké části křivky napětí-deformace byla hodnota modulu stanovena. Obecně mají tkáně nelineární závislost napětí-deformace, modul elasticity se tedy se zátěží mění. V práci je také uvedeno, že byly zkoumány dynamické veličiny a hysteréze vzorků. Ve výsledcích ukázány nejsou, takže není nutné zmiňovat se o nich v metodách. Naopak by bylo vhodné uvést, jak bylo se vzorky zacházeno po odebrání z těla, za jak dlouho po odebrání byly experimenty provedeny, jak bylo zabráněno vysoušení vzorků během měření a dále pak informace o síle uchycení vzorků, počáteční délce vzorků, tloušťce vzorků a zvolené rychlosti zatížení.

V kapitole 3.2.5 a 3.2.6 pojednávající o histologii a mikroskopické kvantifikaci vzorků se některé informace zbytečně opakují.

V kapitolách 3.3.2 a 3.3.3 se liší informace o použitých stezích pro zašití poraněné tkáně. Bylo by tedy vhodné informace ujednotit.

V kapitole 4.2.3 by bylo vhodné uvést i číselné hodnoty objemových podílů kolagenu a tukové tkáně zobrazených na Fig. 31.

V kapitole 4.3.2.1 by bylo vhodné ukázat i číselné hodnoty objemových frakcí kolagenu typu I zobrazených na Fig. 34.

V kapitole 4.4.1. by bylo vhodné přidat i číselné grafy s výsledným uchycením buněk.

Na uchazeče mám během obhajoby tyto dotazy:

1. Předkládaná práce je velmi rozsáhlá a představuje velké množství dílčích úkolů. Zahrnuje přípravu nosičů pomocí elektrostatického zvláčňování, přípravu séra bohatého na krevní destičky, buněčnou kulturu, analýzu uchycení, metabolické aktivity, proliferace a životnosti buněk, operace na zvířatech, mechanická měření, mikroskopickou kvantifikaci struktury, analýzu výsledků a statistickou analýzu. Konkrétně jakými dílčími úkoly se zabýval uchazeč?
2. Kapitola 2 bod 2. a 3. Dá se z histologického a biomechanického hlediska předpokládat stejný výsledek při aplikaci použitých nosičů na jiná zvířata případně lidi a při použití na větší jizvy typu W3? Hraje zde úlohu i věk subjektu? Je v případě větších jizev vyloučeno případné smršťování nebo naopak roztahování nosiče po vložení do rány? Nebo jsou uvedené nosiče vhodnější na nějaký typ poranění dle velikosti či lokace?
3. Kapitola 3.1.1 Je polypropylenové chirurgické síťka (ProleneTM) pravidelná? Jak je zajištěna rovnoměrnost pokrytí této síťky PCL nanovláknem a je výsledek pokrytí reprodukovatelný? Nebo případné nerovnoměrnosti pokrytí síťky nehrají při léčbě poranění zásadní roli?
4. Kapitola 3.1.2 Jak se zjišťuje, že se leukocyty a erytrocyty během centrifugace zcela odstranily ze séra, aby nedocházelo později k imunitní reakci po aplikaci do tkáně? Proces probíhá pod mikroskopem, používá se barvení nebo existuje jiná metoda?
5. Proč byl zvolen roztok TRS s koncentrací krevních destiček $1,06 \times 10^5$ destiček/ μL (kapitola 3.1.3) a 1×10^6 destiček/ μL (kapitola 3.3.1)? V práci je podle literatury uvedena pro zajištění ideální proliferace buněk koncentrace destiček rovna 2,5 násobku fyziologické koncentrace. Běžná koncentrace v lidském těle je $1,5-2 \times 10^5$ destiček/ μL .

- Ovlivňuje koncentrace krevních destiček osázení 3T3 fibroblastů na zkoumané nosiče během inkubační doby nebo koncentrace nemá vliv na množství přichycených buněk?
6. Kapitola 3.2.4 Ze studie Deeken et al. 2011 je patrné, že samotná polypropylenová síťka Prolene™ není izotropní, nemá tedy stejné mechanické vlastnosti ve všech směrech. Ve směru kolmém na nejdelší rozměr síťky byla naměřena přibližně 20 krát větší pevnost než ve směru podélném. Byl tento potenciální rozdíl ve vlastnostech v různých směrech zahrnut do studie a bylo zajištěno, že všechny vzorky byly zatěžovány ve stejném směru?
 7. Kapitola 4.1.1 Jakým způsobem byla kvantifikována náhodná orientace vláken nebo se jednalo pouze o vizuální kontrolu? Co mohlo být důvodem k tomu, že byly sledovány dvě základní frakce průměrů PCL vláken? Podkladním polypropylenovou sítí, metodikou, kolísáním napětí, změnou rychlosti zvlákňování, nebo samotným PCL?
 8. Kapitola 4.1.3 Fig. 25 ukazuje, že polypropylen obecně snižuje životnost 3T3 fibroblastů. Jeví se tedy vhodnější používat nosiče pouze z PCL. Je tomu tak nebo ostatní vlastnosti nosičů pouze z PCL nejsou tak příznivé?

Závěr: Z předložené práce vyplývá, že doktorand prokázal schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a vývoje a k samostatné teoretické i tvůrčí činnosti. Předkládanou disertační práci doporučuji k obhajobě a doporučuji, aby po úspěšné obhajobě byl Mgr. Martinu Plencnerovi udělen vědecký titul Ph.D.


Ing. Petra Kochová, Ph.D.

NTIS - Nové technologie pro informační společnost
Fakulta Aplikovaných Věd
Západočeská Univerzita v Plzni
Univerzitní 22
306 14 Plzeň
tel.: +420 377 632 364, fax: +420 377 632 302
kochovap@ntc.zcu.cz