

Posudek na disertační práci MUDr. Dmitryho Tukmacheva

Disertační práce MUDr. Dmitryho Tukmacheva s názvem „Biomaterials and stem cells in spinal cord injury“ byla vypracována na 2.LF UK v rámci programu Neurovědy a je napsána v angličtině v požadovaném standardním členění na 165 stranách, včetně obrazové dokumentace na 43 obrázcích.

Formálně je disertační práce napsaná až na výjimky (viz níže) na velmi dobré úrovni, psaná kvalitní angličtinou a doprovázena odpovídajícími ilustracemi a tabulkami.

Úvod disertační práce podává na 48 stranách rozsáhlý přehled o patologii traumatického poškození míchy včetně základních buněčných a molekulárních reakcí získaných zejména na experimentálních zvířecích modelech. K této části práce mám několik formálních připomínek:

Str. 23-24, Table 2.: Tabulka je neúplně rozdělena na dvou stranách

Str. 30, tvrzení, že: *Activation of macrophages leads to the increase of inflammatory response, cavitation process and the production of axonal growth inhibitory molecules in the white matter* není zcela správné, protože v současné době víme, že M2 subpopulace makrofágů přináší do tkáně včetně poškozené míchy faktory, které působí neuroprotektivně a s podporou regenerace přerušovaných axonů. Sám doktorand popisuje tuto subpopulaci makrofágů ve výsledcích svých experimentů.

Vzhledem k roku odevzdání práce (2022) by úvodní kapitola měla obsahovat recentní informace a odpovídající citace prací, které by lépe ukázaly pokrok v poznání patogeneze poškozené míchy než citované práce před 10 lety, citované práce jsou z let 2010-2012.

Str. 40: *Since differentiated oligodendrocyte precursors obtained from embryonic stem cells after the transplantation into the spinal cord differentiate into Schwann cells, they maintain remyelination and recovery of locomotor function (Totoiu M.O. and Keirstead H.S., 2005)*. Rád bych věděl, co se myslí termínem „*differentiated oligodendrocyte precursors*”

Přestože jsem se v úvodu zmínil o dobré formální úrovni disertační práce, udivilo mě velké množství citovaných prací, které nejsou uvedeny v seznamu literatury. Jde zejména o publikace citované v subkapitole 1.6. *Biomaterials as scaffolds for spinal cord injury repair* a to v počtu více než 10 autorů.

Materiál a Metody

V této kapitole jsou popsány metody přípravy kombinovaných hydrogelů a jejich osídlení

kmenovými buňkami včetně GFP-pozitivních mesenchymálních kmenových buněk (MKB) s obsahem SPIO nanopartikulí. Působení mesenchymálních kmenových buněk bylo testováno na modelu komprese míchy vyvolané expanzí epidurálně aplikovaného katetru podle metody Vanický et al. 2001. Koncentrace MKB značených SPIO nanopartikulemi v místě poškození míchy byla zvyšována magnetickým systémem. Ten mohl být lépe popsán včetně rozhodnutí, proč doktorand použil podstatně kratší čas působení magnetického pole (2hod) na rozdíl od dosud publikovaných výsledků s dobou působení magnetického pole 12 nebo 24 hod.

Na experimentálním modelu kompletního přerušení míchy byly aplikovány různé kombinace hydrogelů a hydrogelů osídlených MKB značených SPIO nanopartikulemi. K vyhodnocení buněčných reakcí byly popsány imunohistochemické detekce odpovídajících buněčných markerů. V této části disertační práce je popsáno také využití qRT-PCR pro analýzu genové exprese.

Výsledky a diskuse

V první části této kapitoly jsou uvedeny a diskutovány výsledky ilustrující pozitivní působení magnetického pole na koncentraci MKB značených SPIO nanopartikulemi v místě míšní léze. Infiltrace MKB do tkáně míchy byla prokázána i po 2 hod působení magnetického pole.

Výsledky na Fig. 17E by měly být lépe popsány.

Ve druhé části jsou popsány a diskutovány výsledky reakce MKB kultivovaných v podmínkách in vitro na hydrogelech extracelulární matrix připravených z prasečí spinální míchy (SC-ECM) a močového měchýře (UB-ECM). Následně byly analyzovány buněčné reakce po aplikaci těchto hydrogelů do kavity přerušené míchy potkana, přitom nebyly zjištěny rozdíly v jejich reakcích. Oba typy hydrogelů se celkem dobře integrovaly s míšní tkání.

V této části práce jsou uvedeny zajímavé buněčné reakce na přítomnost uvedených hydrogelů bez zjištěných rozdílů mezi nimi také v podmínkách in vivo. Předně byly pozorovány longitudinálně orientované regenerující axony. Aktivované astrocyty se nacházely pouze při okrajích míšní tkáně, ale nemigrovaly do hydrogelů, zatímco krevní cévy zde tvořily bohaté pleteně. Výrazná byla přítomnost M1 subpopulace makrofágů jako reakce míšní tkáně, přitom M2 subpopulace makrofágů byla zjištěna pouze v hydrogelech.

Výsledky behaviorálních testů ilustrující možnou obnovu motorické funkce neprokázaly signifikantní rozdíly ve skoré BBB u kontrolních zvířat s aplikací hydrogelů a zvířat, kterým byl aplikován hydrogel s MKB.

V textu celé práce se vyskytuje nesprávný, neoborný a matoucí pojem a to: *..the neurofilaments ingrowth*. Imunohistochemická detekce neurofilament se používá k vizualizaci rostoucích axonů, ale nikdy nerostou samostatná neurofilamenta, proto použitý termín je z hlediska odbornosti zcela nevhodný a neakceptovatelný.

Formální připomínky

Na Fig. 24, což je graf ukazující větší výskyt regenerujících axonů v testovaných hydrogelech, je mylně uvedeno zvětšení (scale bar), který náleží k předchozímu Fig. 23. Navíc v grafu není uvedena obvyklá forma signifikance rozdílů, přestože ten je zřetelně vizuálně patrný. Podobně je tomu v u Fig. 26 a 27.

V celém textu je použitý nezvyklý formát citovaných autorů s uvedením iniciál jejich jmen, což se všeobecně nepoužívá.

K práci mám na autora následující otázky

Vzhledem k významu hydrogelů v experimentální části disertační práce mám dotaz, zda doktorand připravoval použité hydrogely sám a pokud ne, proč není v práci uvedeno, kde a kým byly hydrogely připraveny.

S tím souvisí i následující dotaz, který je obecně kladen k rozmanité a rozsáhlé experimentální části disertační práce. Jaký byl podíl doktoranda na vzniku uvedených výsledků?

Jaký je názor doktoranda na možné budoucí odborné řešení poraněné míchy při rozhodování, zda použít klasické chirurgické postupy řešení nebo nové metody založené na tkáňovém inženýrství.

Závěr

Přes výše uvedené nedostatky mohu konstatovat, že předložená disertační práce prokazuje schopnosti doktoranda k samostatné vědecké práci, ve které prezentuje řadu kvalitních prioritních výsledků, publikovaných v renomovaných časopisech. Na základě toho proto doporučuji, aby byl MUDr. Dmitryho Tukmacheva po úspěšné obhajobě udělen titul Ph.D. podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Brně 4.3. 2022

Prof. RNDr. Petr Dubový, CSc.