

doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Ústav histologie a embryologie

1. lékařská fakulta – Univerzita Karlova

Albertov 4, Praha 2, tel.:+420224968130, email:tkucer@lf1.cuni.cz

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Terezy Kubíkové v oboru Anatomie, histologie, embryologie s názvem: “Mikroskopické složení a mechanické vlastnosti aorty a plicnice“.

Disertační práce Mgr. Terezy Kubíkové je souborem několika různorodých studií, jejichž pojitkem je morfoloická analýza cévních struktur s přihlédnutím k jejich biomechanickým vlastnostem. Zvláštní důraz byl kladen na získání poznatků, které přispějí k úspěšnější aplikaci různých rekonstrukčních postupů v kardiochirurgii a cévní chirurgii, případně zlepši výsledky některých dalších invazivních přístupů typu radiofrekvenční ablace autonomních nervů ve stěně arterií. Zvolené téma i použité postupy přesně zapadají do oboru, ve kterém je dizertace zpracována, přičemž její výsledky podtrhují trávající potřebu morfoloické analýzy biologického materiálu na tkáňové a buněčné úrovni, samozřejmě ovšem také v kombinaci s dalšími metodickými přístupy. Jedná se tedy o užitečné použití tradičních morfoloických přístupů jako cesty k zodpovězení řady aktuálních otázek v biomedicinském výzkumu.

Jaké konkrétní cíle si tedy autorka ve své disertační práci vytyčila?

- 1) Kvantifikovat zastoupení elastinu, kolagenu, hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu v různých proximodistálních segmentech aorty odlišných věkových skupin prasete, jakožto modelu pro experimentální chirurgii a biomechaniku elastických tepen.
- 2) Zjistit, zda orientace hladkosvalových buněk v tunica media aorty prasete statisticky koreluje s lokálním složením tepenné stěny.
- 3) Zjistit, do jaké míry spolu statisticky koreluje mikroskopické složení kryoprezervovaných alograftů aorty a plicnice s jejich mechanickými vlastnostmi.
- 4) Zjistit, do jaké míry spolu statisticky koreluje mikroskopické složení kryoprezervovaných alograftů aortální a pulmonální chlopně s jejich mechanickými vlastnostmi.

5) Zjistit, jakou úlohu hraje systém mechanických lamel při šíření experimentálně navozené trhliny v kryoprezervovaných alograftech aorty a plicnice.

6) Zjistit rozsah poškození renální tepny ovce na histologické úrovni při experimentální renální denervaci a posoudit účinnost dvou typů katétrů používaných k radiofrekvenční ablacii.

7) Zjistit rozdíl v osídlení a stavbě dvou typů cévních náhrad po jejich implantaci místo myší břišní aorty po deseti dnech a šesti měsících.

Co se týče zvoleného postupu a spektra použitých metod, mohu konstatovat, že plně odpovídají potřebě této práce. Autorka hojně využívala světelnou mikroskopii, celou paletu histologických barvení, imunohistochemii a kvantitativní morfologii. Zvláštní důraz byl kladen na systematický náhodný výběr hodnocených částek tkáně, jakož i hodnocených snímků. Pro kvantifikaci autorka použila různé stereologické metody a data byla podrobena rigoróznímu statistickému hodnocení při použití různých testů dle potřeby. Aplikovány byly též různé biofyzikální testy k hodnocení mechanických vlastností tkání. U několika studií také histologická analýza navazovala na různé experimentální chirurgické přístupy.

Práce Mgr. Kubíkové přinesla tyto původní výsledky:

1) Při porovnání hrudní vzestupné aorty a břišní suprarenální aorty prasete byly nalezeny význačné rozdíly v zastoupení elastinu, kolagenu, hladkosvalového aktinu, desminu a vimentinu.

2) Statistické rozdělení orientací dvou symetrických šroubovic hladkých svalových buněk medie souvisí s lokálními změnami zastoupení kontraktilního fenotypu těchto buněk a rovněž se změnami zastoupení kolagenu a elastinu.

3) Histologická analýza kryoprezervovaných štěpů aorty a plicnice po biomechanickém měření ukázala, že elastin omezuje šíření trhlín jejich stěnou.

4) U ovčího modelu byl popsán rozsah a stupeň poškození tepenné stěny a jejího okolí při použití dvou katétrů testovaných pro radiofrekvenční ablacii endovaskulární cestou.

5) Bylo prokázáno, že vhodně tvarované nanovláknové nosiče mohou u myši po dobu 6 měsíců plnit úlohu aorty, přičemž dochází k osídlení štěpu buňkami typickými pro jednotlivé vrstvy cévní stěny.

Všechny tyto původní výsledky považuji za velmi cenný příspěvek k poznání struktury a funkce jednotlivých součástí velkých cév a příslušných srdečních chlopní. Vytčené cíle byly splněny.

Po formální stránce má disertační práce Mgr. Terezy Kubíkové formu shrnutí výsledků, které byly většinou samostatně publikovány v odborných časopisech. Práce splňuje požadovaná formální kritéria. Práci tvoří 122 stran textu s bohatou obrazovou dokumentací vynikající kvality, která zahrnuje 32 obrázků. Bohatě citovaná související literatura tvoří seznam na 15 stranách textu. Součástí práce je i seznam publikací autorky, z nichž 6 má bezprostřední vztah k tématu disertace, přičemž tyto práce jsou připojeny jako přílohy.

Disertační práce je vzorně uspořádaná podle obvyklého způsobu. Obsahuje tedy abstrakt, úvod, hypotézy a cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi k jednotlivým bodům disertace, závěr a seznam zkratk. Po jazykové stránce je práce vyhovující, ale musím s politováním konstatovat, že se autorka nevyvarovala občasných překlepů. Závažnější nedostatky textu dizertace jsou následující:

1) Teoretický úvod je mozaikovitý popis různých oblastí cévní biologie a patologie. Domnívám se, že zde chybí větší zacílení na problematiku přímo řešenou v disertační práci.

V tomto úvodu se také vyskytuje několik problematických pasáží a zřejmě nepřesných citací původní literatury někdy zahrnující terminologické odchylky i věcné chyby:

- Weibel-Paladeho částice by bylo správnější označovat jako tělíška (tak se označují i jiné cytologické útvary – např. lamelární tělíška, denzní tělíška etc.)
- perlekan je nesprávně zařazen mezi glykoproteiny, ale je to proteoglykan
- v případě buněk hladké svaloviny by pro obal tvořený ECM byl vhodnější termín lamina externa místo lamina basalis či bazální membrána (ten je vhodný u endotelu, epitelu a jiných polarizovaných buněk)
- oponentovi není nic známo o možnosti hromadění škrobu v živočišných tkáních – citace Mills, 2012, je oponentovi nedostupná
- od úvodu dále se operuje s termínem endoteliální, který by měl být nahrazen pojmem endotelový. V jiné kapitole se v jednom odstavci používají oba termíny.

2) na straně 50. se chybně hovoří o elastických vláknech, když je evidentní že se jedná o elastické lamely (membrány)

Dotazy a připomínky k obhajobě:

1) Jaké typy integrinů by autorka dizertace očekávala u různých typů buněk hladké svaloviny, které pozorovala v jednotlivých segmentech prasečí aorty? Pokusila se tyto receptory detekovat, případně detekovat i jiné komponenty ECM v lamina externa (laminin, kolagen IV)?

2) Při studiu buněčného složení cévní náhrady po implantaci byly použity štěpy uvolňující NO. Jaký NO donor byl použit?

3) Ve výše zmíněné studii je popisován pokryv štěpu endotelem, který byl negativní na některé endotelové markery. Může autorka dizertace vyloučit, že se nejednalo o migrující fibroblasty, případně adheující leukocyty? Proč nebyly použity i jiné markery – isolektinB4, anti-VEGFR2 receptor, VE-cadherin?

4) Jak si autorka dizertace vysvětluje vznik chrupavky ve štěpu? Muselo se skutečně jednat o metaplázii – tj. vznik jiného typu diferencované tkáně z již diferencované pojivové tkáně, nebo autorka připouští i přímou diferenciaci chondroblastů z nediferencovaných mezenchymových buněk z okolí?

Závěrem konstatuji, že disertační práce Mgr. Terezy Kubíkové je kvalitním dílem a prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci. Proto tuto práci jednoznačně **doporučuji** k obhajobě a po jejím úspěšném vykonání i udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. autorce – Mgr. Tereze Kubíkové - podle platných právních předpisů.

V Praze dne 5.7.2017.

~~doc.~~ MUDr. Tomáš Kučera. Ph.D.