

Doc. Mgr. Vladan Bernard, Ph.D.
Biofyzikální ústav
Lékařská fakulta
Masarykova univerzita
Kamenice 5
62500 Brno

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Ludmily Žárské

s názvem

Fotodynamicky aktivní látky a jejich použití pro fotodynamickou terapii

Předložená práce autorky Mgr. Ludmily Žárské se majoritně věnuje studiu fotodynamicky aktivních látek a jejich interakci s vybranými buněčnými liniemi s důrazem na studium ovlivnění základních buněčných pochodů. Minoritní část práce prezentuje výsledky experimentů věnujících mikročasticím a studiu jejich antibakteriálních účinků.

Disertační práce má charakter uceleného textu standardního formátu a obsahu. Práce má celkem 110 číslovaných stran textu včetně souhrnu citací a seznamu publikační aktivity autorky. Celá práce je členěna do 9 kapitol zahrnujících kapitolu drobnému úvodu, kapitolu stanovující výzkumné cíle, kapitolu popisu současného stavu poznání v dané oblasti na základě literární rešerše, kapitolu experimentální části věnující se popisu použitého materiálu a metod, kapitolu prezentující výsledky, kapitolu obsahem zaměřenou na diskuzi nad získanými výsledky a poslední kapitolu v podobě závěrečného hodnocení. Dále obsahuje práce samostatné kapitoly použitých literárních zdrojů a výčet publikační činnosti autorky.

V první kapitole „Úvod“ seznamuje autorka čtenáře s celkovou ideou práce a problematikou fotodynamické terapie při nádorovém onemocnění. Této úvodní kapitole v textu práce předchází samostatně nečíslovaný seznam zkratk a obsah práce. Druhá kapitola nazvaná „Teoretická část“ je obsahově nejobsáhlejší. Sestává se z několika podkapitol, které jsou výsledkem literární rešerše provedené autorkou na téma fotodynamická terapie a biodegradabilní polymery. Patří sem například stať věnující se mechanismům fotodynamické reakce, fotosenzitivním látkám, světelným zdrojům či mechanismům destrukce nádoru. V třetí kapitole „Cíle práce“ autorka pomocí pěti bodů stručně definovala vytyčené cíle práce své disertační práce.

Následuje kapitola čtvrtá nazvaná „Materiál a metody“. Zde se autorka věnuje popisu použitých fotosenzitivních látek, zvoleným buněčným liniím, zdroji záření a ozařovacímu protokolu a jednotlivým kvalitativně kvantitativním analytickým metodám použitým pro popis ovlivnění základních buněčných

pochodů včetně zobrazení mikroskopií atomárních sil či statistickému zpracování dat. Navazující pátá kapitola „Výsledky“ prezentuje a přiměřeně hodnotí dle stanovených cílů získané výsledky provedených experimentů a měření. Tato kapitola je vhodně členěna do několika podkapitol, věnujících se jednotlivým dílčím experimentům či měřením. V textu jsou postupně prezentována data V podkapitolách nazvaných „In vitro studie fotodynamického efektu porfyrinových fotosenzitizérů TMPyP a ZnTPPS4 na nádorové linie“, „Biologické hodnocení fotodynamického účinku zprostředkovaného TPP-NP“ a „Mikročástice PLGA“. Šestou kapitolou je „Diskuze“, v které jsou v přiměřeném rozsahu získaná data konfrontována s dostupnými daty a výsledky experimentů jiných výzkumných týmů. Autorka se zde samostatně věnuje všem třem podkapitolám definovaným v kapitole pět.

V kapitole „Závěr“, tj. sedmé kapitole textu, se autorka na dvou stranách jasně a smyslně hodnotí získané výsledky a vyjadřuje se k jejich validitě.

Seznam citací a použitých literárních zdrojů uvedený na konci disertační práce obsahuje přes 170 odkazů na relevantní výzkumné či souhrnné práce a internetové zdroje. V citačních zdrojích jsou zastoupeny až na výjimky periodika s „impakt faktorem“ a se zejména novějším datem publikování. Předložená práce je tak dobře zasazena do kontextu současné vědy a reaguje na aktuální výsledky výzkumu.

Po stránce stylistické a kvality text je práce na dobré úrovni. Kapitoly textu na sebe logicky navazují a vzájemně se doplňují, text neobsahuje žádné špatně srozumitelné pasáže.

Drobnou poznámku si dovoluji k textu kapitoly 2, respektive podkapitoly 2.1.6.1.2 LED diodové zdroje. V této kapitole shledávám mírnou nekonzistenci a chybovost v uvádění fyzikálního popisu vlastností LED zdrojů, konkrétně zmíněného výkonu v jednotkách V či dále v textu v jednotkách W/cm². Další poznámku směřuji k obrázku 37., kde postrádám údaj o použitých jednotkách kvalitativního popisu distribuce velikosti částic.

Také si dovoluji osobní názor, že zařazení poslední kapitoly věnující se syntéze a aplikaci mikročástic jakožto materiálu s antibakteriálním účinkem do textu práce bylo možná až zbytečné. A to s ohledem na primární zaměření disertační práce ale také s ohledem na fakt dostatečného rozsahu experimentální části věnující se fotosenzitivním látkám. Zařazení diskutované kapitoly ale určitě nesnižuje kvalitu práce a doplňuje na druhou stranu představu o širokých schopnostech a znalostech autorky.

Předloženou práci hodnotím jako zdařilou a ve svém obsahu přínosnou. Autorka v praktické části prezentuje velké množství dat, které byla schopna také dále v části diskuze zpracovat do souhrnné podoby a využít je k hodnocení vytyčených cílů. Považuji za vhodné také uvést poznámku o velkém objemu laboratorních metod a technik, které byly v dané *in vitro* studii fotosenzitizérů i mikročástic použity.

Prezentované experimentální studie mají reálné opodstatnění, zejména s přihlédnutím k zvyšující se incidenci nádorových onemocnění a nespornému benefitu zvolené fotodynamické terapie v podobě cílené léčby. Proto je zvolené téma z medicínského a společenského hlediska velmi aktuální. Vlastní práce obsahuje množství cenných experimentálních dat, které je možno použít pro další vývoj a zdokonalení metody fotodynamické terapie.

Hodnocená disertační práce vykazuje všechny znaky pro splnění podmínek samostatné tvůrčí vědecké práce a obsahuje původní vědecké výsledky. Tyto byly autorkou publikovány v sedmi původních vědeckých publikacích časopisů s IF, přičemž z toho tři prvoautorsky. Soupis autorčiných publikačních činností také zahrnuje osm konferenčních abstraktů na akcích mezinárodního významu. Prezentovaná četná publikační aktivita autorky ukazuje na její vysoký zájem a orientaci v oblasti vědy.

Na základě rozboru disertační práce, posouzení její vědecké úrovně, zhodnocení stanovených cílů a dosažených výsledků konstatuji, že práce splňuje obecné požadavky kladené na disertační práci v lékařských oborech. Veškeré zmíněné připomínky uvedené v posudku jsou v akceptovatelné míře a nesnižují celkovou kvalitu předkládané disertace.

Předloženou disertační práci Mgr. Ludmily Žárské „Fotodynamicky aktivní látky a jejich použití pro fotodynamickou terapii“ doporučuji k obhajobě pro udělení akademického titulu Ph.D. (podle §47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.)

Otázky k obhajobě:

Prosím o objasnění, proč byl pro statistické hodnocení a grafické znázornění dat zvolen průměr a standardní odchylka namísto možnosti zvolit například medián a kvartilový rozptyl s grafickou vizualizací box-plot grafy.

Z textu nejsem zcela schopen pochopit, kolik jednotlivých dat bylo pro statistické hodnocení použito. V textu stojí že byl každý vzorek testován devětkrát (dvanáctkrát) – kap. 4.8. Mám toto chápat jako devět (dvanáct) samostatných nezávislých vzorků, či devět (dvanáct) mikrotitračních destiček vždy po 96 vzorcích téhož experimentu?

Současně bych se také rád zeptal, jaký statistický test nulové hypotézy porovnání souborů dat byl použit a zda byla data testována na normalitu (viz volba průměru a směrodatné odchylky).

V Brně 22.11.2022

doc. Mgr. Vladan Bernard, Ph.D.

Mgr. Jaromír Vachutka, Ph.D.
Ústav lékařské biofyziky LF UP v Olomouci
Hněvotínská 3
779 00 Olomouc

Oponentský posudek disertační práce

Mgr. Ludmily Žárské

na téma

Fotodynamicky aktivní látky a jejich použití pro fotodynamickou terapii

Studijní program: Lékařská biofyzika

Disertační práce předložená k oponentuře je zaměřena na studium a ověřování účinnosti fotosenzitizérů druhé a třetí generace na nádorových a nenádorových buněčných liniích. Autorka se rovněž věnovala syntéze, modifikaci a charakterizaci mikročástic na bázi kyseliny poly (mléčné – co – glykolové) (PLGA MP) a studiu jejich antibakteriálního efektu na vybrané bakteriální kmeny.

Autorka si v rámci postgraduálního studia vytyčila následující cíle:

- *in vitro* ověření fotodynamické aktivity porfyrinových fotosenzitizérů TMPyP a ZnTPPS4 na nádorových liniích HeLa a G361
- *in vitro* studium fotodynamické aktivity sulfonovaných polystyrenových nanočástic se zapouzdřeným fotosenzitizérem TPP (TPP-NP) na třech buněčných liniích (NIH3T3, HeLa a G361)
- syntéza a charakterizace PLGA MP
- funkcionalizace PLGA MP
- ověřování antibakteriální aktivity modifikovaných PLGA MP

Celkový rozsah práce je 110 stran včetně seznamu použité literatury a přehledu publikační činnosti autorky. Disertační práce má standardní formát a jedná se o ucelený text přehledně rozdělený do 9 kapitol, které zahrnují jak úvodní teoretickou část, tak i popis experimentální činnosti autorky včetně dosažených výsledků a diskuze.

Teoretická část práce je podložena rešerší čítající 169 literárních zdrojů a 4 odkazy na internetové zdroje. Přibližně třetina citovaných prací byla vydána v posledních pěti letech a naprostá většina jich pochází ze zahraničních impaktovaných časopisů. Použité zdroje tak dobře odrážejí aktuální stav vědeckého poznání v dané oblasti. V úvodní kapitole autorka zasazuje problematiku fotodynamické terapie (PDT) do širšího kontextu jednotlivých strategií protinádorové léčby a v následující teoretické části popisuje samotný princip této terapeutické metody včetně historického vývoje a jednotlivých

mechanismů účinku. Dále podává přehled fotosenzitizérů včetně jejich klasifikace a rozdělení do příslušných generací. Autorka se rovněž věnuje světelným zdrojům používaným pro navození fotodynamického jevu a mechanismům cytotoxicity zprostředkované PDT. Z hlediska řešené problematiky se jako velice zajímavá jeví podkapitola zaměřená na nové strategie PDT a zejména potom možnosti využití nanotechnologií v PDT. Teoretická část je zakončena podkapitolou shrnující informace o biodegradabilních polymerech s důrazem na PLGA.

Experimentální část práce začíná standardně výčtem a podrobným popisem využitého materiálu a zvolených metod. Autorka seznamuje čtenáře s použitými buněčnými liniemi, bakteriálními kmeny a fotosenzitizéry. Detailně uvádí zvolený protokol měření a provedené metody zahrnující MTT test pro hodnocení životnosti buněk, měření produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), měření mitochondriálního membránového potenciálu a zobrazení mikroskopií atomárních sil (AFM). Věnuje se rovněž popisu syntézy mikročastic PLGA, jejich povrchové úpravě a stanovení antibakteriálního efektu. Všechny metody včetně statistického zpracování dat jsou uvedeny v dostatečné míře.

Výsledky dosažené autorkou práce jsou shrnuty v následující části většinou formou přehledných sloupcových grafů včetně vyznačení statistické významnosti. Grafy jsou doplněné podrobnými popisky a rovněž textovým komentářem, který zahrnuje všechna důležitá zjištění. Výsledky jsou členěny podle jednotlivých cílů vytyčených autorkou. Velice názorně působí především zobrazení jednotlivých buněk před a po fotodynamické terapii prostřednictvím AFM 2D topografie. Následuje diskuze čítající celkem 8 stran, v níž autorka konfrontuje nově zjištěné výsledky s informacemi dostupnými v literatuře. V diskuzi jsou v přiměřené míře zhodnocena všechna důležitá fakta. Závěr práce pak již jen stručně uvádí nejdůležitější poznatky získané v rámci disertační práce.

Z formálního hlediska je práce psána na dobré jazykové úrovni a obsahuje pouze minimum překlepů. V textu se vyskytla jedna nerozvedená zkratka (ALA na str. 31), která není uvedena ani v seznamu zkratek. Citování internetových zdrojů v textu práce ani jejich uvedení v seznamu literatury neodpovídá příslušné citační normě. Za zmínku stojí rovněž nižší tisková kvalita některých grafů v kapitole výsledky (především obr. 38 – 41).

K práci mám následující dotazy:

- 1) V úvodu práce je uvedeno, že ideální fotosenzitizér by měl vykazovat vyšší absorpci v oblasti tzv. terapeutického okna (600 - 850 nm) a naopak nízkou absorpci v oblasti spektrálního maxima denního světla (400 - 600 nm) z důvodu možné fotosenzitizace kůže. Naproti tomu byl k navození fotodynamického jevu použitý LED diodový zdroj o vlnové délce 414 nm. Jaká jsou tedy absorpční maxima použitých fotosenzitizérů? Nesnižuje nižší použitá vlnová délka potenciál využití těchto fotosenzitizérů v případných budoucích klinických aplikacích?

- 2) Jak si vysvětlujete, že při ozáření delším než 1 min nebyla produkce ROS při použití TPP-NP v případě nádorových linií závislá na koncentraci fotosenzitizéru? Došlo k maximální možné produkci ROS již při kratších ozařovacích časech, respektive nižších koncentracích fotosenzitizéru? Nebo mohla být příčinou saturace příslušné měřící metody a vyšší produkci ROS již nebylo možné při daném nastavení experimentu stanovit?
- 3) Existují v literatuře data, která by ukazovala účinek samotného fotosenzitizéru TPP na studované buněčné linie? Pokud ano, je možné porovnat, nakolik došlo díky zapouzdření TPP do sulfonovaných polystyrenových nanočástic ke zvýšení cytotoxického efektu?

Celkově lze konstatovat, že práce je psána na vysoce aktuální téma, protože jak různé strategie léčby zhoubných nádorů, tak i hledání nových látek s antibakteriální aktivitou patří k největším výzvám současné lékařské vědy. Autorka si během studia osvojila celou řadu metod, které pak využila v rámci daného oboru k získání nových poznatků. Prokázala, že výraznější fotodynamický efekt byl dosažen u nádorových linií po aplikaci fotosenzitizéru TMPyP, a zároveň, že citlivější vůči tomuto typu terapie jsou HeLa buňky. Porovnála rovněž účinnost sulfonovaných polystyrenových nanočástic se zapouzdřeným fotosenzitizérem TPP na nenádorových a nádorových buněčných liniích, kde byl zjištěn významný cytotoxický efekt na nádorové buňky a zároveň výrazně nižší účinek u nenádorových buněk. Autorka se rovněž podílela na přípravě a modifikaci PLGA MP a následně úspěšně ověřila jejich antibakteriální účinek na bakteriálních kmenech *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Stanovených cílů práce tedy bylo dosaženo, a to za použití vhodných metod.

Vysokou kvalitu práce rovněž dokládá četná publikační aktivita autorky a řada konferenčních příspěvků. Původní vědecké výsledky dosažené v této práci byly opublikovány ve dvou prvoautorských článcích uveřejněných v prestižních zahraničních časopisech s vysokým impakt faktorem. Autorka se rovněž spoluautorsky podílela na dalších 4 impaktovaných publikacích, které úzce souvisí s tématem disertační práce.

Autorka v předložené disertační práci prokázala schopnost samostatné vědecké činnosti. Disertační práce splňuje i přes uvedené drobné výhrady požadavky stanovené na závěrečné práce v daném oboru.

Disertační práci autorky Mgr. Ludmily Žárské na téma „Fotodynamicky aktivní látky a jejich použití pro fotodynamickou terapii“ doporučuji k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby souhlasím s udělením akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci dne 25. 11. 2022

Mgt. Jaromír Vachutka, Ph.D.