

OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci **MUDr. Petra Koláře**, studenta kombinované formy doktorského studijního programu Lékařská biofyzika na LF UP v Olomouci, nazvanou „**Studium buněčného poškození po aplikaci fotodynamicky aktivních látek, záření a ultrazvuku s využitím fluorescenčních metod a mikroskopie atomárních sil**“.

Vlastní posouzení práce

Předložená práce se zabývá možnostmi využití kombinace elektromagnetického záření ultrazvuku a aktivních látek pro navození buněčné smrti v nádorových buňkách prostřednictvím fotodynamické a sonodynamické reakce. Buněčné poškození je ověřováno moderními mikroskopickými metodami a především s využitím mikroskopie atomárních sil. Předložená práce má 142 stran. Seznam literatury obsahuje celkem 103 citací (5 internetových zdrojů), z toho 76 citací je z posledních 10 let. Členění práce do kapitol je zvoleno účelově. Je rozdělena na dva větší celky: teoretická část a experimentální část. Cíle jsou jasně stanoveny v úvodu práce, závěrečná kapitola pak výstižně shrnuje dosažené výsledky a z nich plynoucí závěry.

V teoretické úvodní části (28 stran) jsou popsány zobrazovací metody světelné mikroskopie, elektronové mikroskopie a mikroskopie atomárních sil (AFM). Velká pozornost je věnována možnostem měření mechanických vlastností buněk. V další části jsou shrnuty současné poznatky o fotodynamické a sonodynamické reakci. Fotodynamická a sonodynamická reakce jsou základem pro fotodynamickou a sonodynamickou terapii nádorů, která je v této práci studována in vitro fluorescenčními metodami studia buněčného poškození a především pomocí mikroskopie atomárních sil.

Výsledková část práce je zpracována jako soubor komentovaných prací publikovaných v impaktovaných a recenzovaných časopisech. Vlastní komentář je rozdělen do dvou logických celků v rozsahu 28 stran a je doplněn citacemi odborné literatury. V první části se autor zabývá vlivem fotodynamické a sonodynamické reakce na buněčné systémy in vitro a v druhé části studiem buněčného poškození a mechanických vlastností s využitím mikroskopie atomárních sil. Použité a popsané metodiky byly velmi dobře zvoleny.

Výsledková část v rozsahu 71 stran je tvořena souborem 9 vlastních odborných prací, kde je autor disertační práce hlavním autorem nebo spoluautorem. Autor se významně podílel na zavedení metod umožňujících detekci mechanických vlastností vzorů a metod pro ověřování Youngova modulu, deformace, adheze a disipace energie. Podílel se rovněž na zavedení metody pro studium vlastností liposomů a pro studium řízeného uvolňování léčiv ultrazvukem, kde se mikroskopie atomárních sil ukázala jako vhodná technika. Vliv a mechanismy fotodynamické a sonodynamické reakce prezentoval na různých typech nádorových buněčných linií při použití porfyrinových sensitizérů TPPS4, ZnTPPS4, PdTPPS4 a derivátů ftalocyaninu CIA1PcS2 o různých koncentracích, světla vhodné vlnové délky a ultrazvuku. Byly optimalizovány ozařovací a ozvučovací podmínky pro navození fotodynamické a sonodynamické reakce na buněčných liniích a byl prokázán synergický účinek fotodynamické a sonodynamické reakce.

Význam pro praxi

Dosažené výsledky jsou kvalitním přínosem nejen v oblasti fotodynamické a sonodynamické terapie, ale i v oblasti vývoje nových aktivních látek.

Autor svou prací velmi přispěl k rozvoji oboru a významné výsledky publikoval v impaktovaných časopisech citačním ohlasem dle SCI 50. Stanovené cíle práce byly v celém rozsahu splněny.

Připomínky a dotazy

Práce je velmi pečlivě zpracována, mám minimum připomínek a dotazů, které nesnižují vysokou kvalitu předložené práce.

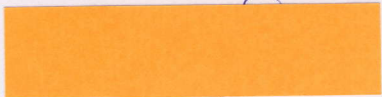
- Můžete mi zdůvodnit, proč jste si vybral pro in vitro studium buněčného poškození právě linie A549, G361, B16F0, Hela a NIH3T3? Ověřoval jste účinky fotodynamických reakcí i na jiných modelech?
- Jaké je využití nově zavedené metody měření mechanických vlastností buněk v klinické praxi?
- Na straně 53 používáte pro modul pružnosti jednotku Arb. Můžete vysvětlit použití této jednotky ve vztahu k interpretaci vašich výsledků?

Závěr

Po celkovém posouzení předložené disertační práce MUDr. Petra Koláře mohu konstatovat, že práce splňuje v plném rozsahu podmínky pro disertační práce, formulované v § 47 VŠ zákona 111/98 Sb. Autor, vynikající úrovní své disertační práce, prokázal schopnost samostatné vědecké práce.

Doporučuji přijetí předložené práce MUDr. Petra Koláře k obhajobě. Doporučuji, aby byl MUDr. Petru Kolářovi po úspěšné obhajobě přiznán vědecký titul Ph.D.

V Brně 24.5.2014



Doc. RNDr. Jiřina Škorpíková.CSc.
Biofyzikální ústav LF MU Brno

Oponentský posudek

Název práce: Studium buněčného poškození po aplikaci fotodynamicky aktivních látek, záření a ultrazvuku s využitím fluorescenčních metod a mikroskopie atomárních sil.

Autor: MUDr. Petr Kolář

Školitel: Doc. Ing. Kateřina Tománková, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP Olomouc

Oponent: MUDr. Dagmar Jírová, CSc.

Pracoviště: Státní zdravotní ústav, Praha

Disertační práce o rozsahu 142 stran se zabývá aktuální problematikou související s možnostmi využití moderních fyzikálních metod a mikroskopie atomárních sil ke studiu buněčného poškození po fotodynamické a sonodynamické terapii. Byly studovány účinky porfyrinových sensitizérů TPPS₄, ZnTPPS₄, PdTPPS₄ a derivátů ftalocyaninu ClAlPcS₂ v kombinaci se zářením vhodné vlnové délky na buněčných liniích adenokarcinomu plic A549, lidského melanomu G361, myšního melanomu B16FO, nádoru děložního hrdla HeLa a nenádorové buněčné linie myších fibroblastů NIH3T3 in vitro. Vliv sensitizérů o různých koncentracích, záření a ultrazvuku na životnost buněk, na produkci reaktivních forem kyslíku a na změny v mechanických vlastnostech, byl studován prostřednictvím fluorescenční mikroskopie, spektrofotometrie a pomocí mikroskopie atomárních sil. Autor ověřil efektivnost navržených postupů a metod pro navození vysoké fotodynamické účinnosti nově vyvíjených sensitizérů.

V teoretické části práce jsou na 28 stranách shrnuty nové poznatky o moderních mikroskopických technikách a velmi přehledně zpracovány současné poznatky o mechanismech účinků fotodynamických a sonodynamických reakcí. Experimentální část práce v rozsahu 99 stran je předložena ve formě komentovaného souboru 9 publikací doplněna citacemi odborné literatury. Jedním z cílů řešení práce bylo zavedení metody umožňující měření mechanických vlastností buněk s využitím mikroskopie atomárních sil. Výsledky práce naznačují, že tato metoda může najít své využití v různých biomedicínských aplikacích, kde je třeba kromě zobrazení povrchu stanovit i mechanické vlastnosti vzorků (např. formy deformace, adhezi, modul pružnosti). Tato stanovení pak umožní studovat charakter buněčného poškození.

Autor se zaměřil na identifikaci účinku sensitizérů na buněčné linie společensky závažných typů karcinomů, jako je adenokarcinom plic, maligní melanom nebo karcinom hrdla děložního. Studoval vliv porfyrinových sensitizérů a derivátů ftalocyaninu o různých koncentracích, vliv záření a ultrazvuku na životnost buněk, na produkci reaktivních forem kyslíku, na změny v mechanických vlastnostech buněk a změny v cytoskeletu. K identifikaci změn byly využívány metody fluorescenční mikroskopie a mikroskopie atomárních sil.

Při studiu fotototoxické reakce na různých typech nádorových buněčných linií autor prokázal, že všechny nově vyvíjené sensitizery jsou fotodynamicky účinné. Ověřil, že efektivní kombinací fotodynamické a sonodynamické reakce dochází k významnému poškození buněk a snížení jejich životnosti. V experimentálním systému in vitro autor prokázal, že pro účinnou aktivaci sensitizérů je možno využít synergický účinek fotodynamické a sonodynamické terapie s pomocí ultrazvuku. Potvrdil, že kombinace fotodynamické a sonodynamické reakce vede k efektivnímu navození buněčného poškození, přičemž je klinicky omezena systémová fototoxicita, ale zachována vysoká terapeutická účinnost.

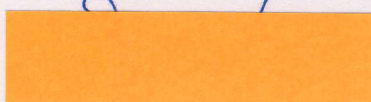
Dotazy a připomínky:

1. Na straně 55 je nedostatečný popis obrázku č. 15. Pokud obrázek demonstruje změny mechanických vlastností fotodynamické reakci, chybí údaje definující ozáření buněk.
2. Pro studium buněčné životnosti jste používal MTT test. Jaké další metody pro studium buněčného poškození by se daly použít?
3. Jaký je pathofyziologický mechanismus přednostního vychytávání fotodynamicky aktivní látky v nádorové tkáni?

Závěr:

Výše uvedené připomínky významně nesnižují kvalitu předložené práce. Autor prokázal schopnost vědecké práce v rámci svého oboru. Předloženou disertační práci MUDr. Petra Koláře **doporučuji k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.**

V Praze dne 20.5.2014



MUDr. Dagmar Jírová, CSc.
Odborný náměstek ředitele, vedoucí
Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti
Národní referenční laboratoř pro experimentální imunotoxikologii

telefon: +420 26708 2439, 724233896

E-mail: jirova@szu.cz