



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, tř. Svobody 8, 771 26 Olomouc

V Olomouci 14. června 2017

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská biofyzika

Mgr. Jakub Malohlava, student prezenční formy doktorského studijního programu
Lékařská biofyzika na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „Studium účinků fotodynamicky aktivních látek s využitím moderních
mikroskopických metod sil“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 14. června 2017 v 10:00 hod.

Komise:

předseda: prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc. ✓

místopředseda: prof. Ing. Jan Hálek, CSc. ✓

členové: doc. RNDr. Jiřina Škorpíková, CSc. ✓

MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D. ✓

doc. Ing. Josef Hanuš, CSc. ✓

Oponenti:

doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc. ✓
Katedra experimentální fyziky, PŘF UP v Olomouci

Mgr. Vladan Bernard, Ph.D. ✓
Ústav lékařské biofyziky LF MU v Brně

Školitel: doc. Ing. Kateřina Bardoň Tománková, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího
školícího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své
posudky. Uchazeč odpověděl na připomínky a dotazy oponentů.

Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo členů komise. Kladně hlasovalo členů, záporně členů,
neplatných lístků bylo odevzdáno

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Jakub Malohlava** obhájil disertační
práci a doporučili udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých
školách č. 111/98 Sb.

.....
prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.
předsedkyně komise

Obhajoba disertační práce – zápis o diskuzi

Název práce: STUDIUM ÚČINKŮ FOTODYNAMICKY AKTIVNÍCH LÁTEK S VYUŽITÍM MODERNÍCH MIKROSKOPICKÝCH METOD

Autor práce: Mgr. Jakub Malohlava

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

Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP

Oponenti práce: Mgr. Vladan Bernard, Ph.D., doc.RNDr. Roman Kubínek, CSc.

Datum obhajoby: 14. 6. 2017

Dotazy a odpovědi oponentů

posudek - Mgr. Vladan Bernard, Ph.D

Dotaz:

V práci informujete o provedeném testování účinků fotosensitizerů (testy cytotoxicity) na jednotlivé buněčné linie pomocí metody MTT. Ve výsledcích uvádíte pouze porovnání viability při koncentracích IC₅₀ mezi nádorovými a nenádorovými buňkami, nikoliv již pro jednotlivé typy sensitizerů a taktéž bez konkrétních koncentračních hodnot. Můžete tyto hodnoty uvést a srovnat pro jednotlivé typy použitých sensitizerů a typů buněčných linií?

Odpověď:

Pro buněčnou linii HeLa a PS MgTPPS₄ byla hodnota IC₅₀ 10 μM, TMPyP 0,1 μM. Pro buněčnou linii G361 a PS ZnTPPS₄ 2,5 μM a NIH 3T3 16 μM. Pro buněčnou linii HeLa měl vyšší účinnost sensitizer TMPyP. Hodnota IC₅₀ také závisí na množství energie předané ozářením, v tomto případě se vždy jednalo o 5 J/cm².

Dotaz:

Můžete celkově zhodnotit jednotlivé použité sensitizer a vyslovit svoji domněnku, který z testovaných fotosensitizerů je nejvhodnější pro aplikaci ve fotodynamické terapii dle Vámi získaných dat (v souladu s dílčím cílem práce: Ověřit účinnost fotodynamické terapie *in vitro* s využitím nově vyvíjených porfyrinových sensitizerů)?

Odpověď:

Všechny studované PS statisticky významně mění hodnoty mechanických vlastností, konkrétně YM, u nádorových buněčných linií. Pouze z hodnot IC₅₀ je nejúčinnější PS TMPyP. Je však třeba brát v potaz, že jeden sensitizer není vhodný pro všechny druhy nádorů. Akumulace PS, kdy se PS nashromáždí a zůstane po nějaký čas v cílové tkáni, je komplexní

proces, který ovlivňuje řada faktorů, jako jsou fyzikálně-chemické vlastnosti PS, cévní zásobení a metabolismus cílové tkáně. Studované PS jsou studovány in vitro a jsou tedy součástí základního výzkumu. Schválené PS, např. ALA, se používá u cervikální dysplazie, nemelanotické rakoviny kůže, Barretova jícnu nebo psoriázy.

posudek - doc.RNDr. Roman Kubínek, CSc.

Dotaz:

Na str. 12₇ a 12₁₀ se uvádí, že návrat PS do základního stavu je následován fluorescencí a o 3 řádky se slovem „opět“ může nastat fosforescence. Jaký proces tedy nastane?

Odpověď:

V souvislosti V práci je popsán popis deexcitace, přičemž jsou ozřejměny jednotlivé procesy deexcitace, kdy ze S_1 do základního stavu s luminiscenčním přechodem je nazývána jako fluorescence a z T_1 do základního stavu s luminiscenčním přechodem jako fosforescence, u které také nastává k časové prodlevě oproti fluorescenci. Obecně nelze určit, že PS se vydává jen cestou fluorescence nebo fosforescence. Kromě zářivých přechodů také nastávají nezářivé přechody, hlavně ve formě tepla.

Dotaz:

V souvislosti s výčtem fotosenzitizérů a informací na str. 22, že jsou i zapouzdřené v nanočásticích, mám dotaz do diskuze, zda se disertant setkal v literatuře či v praxi s jinými formami nanostruktur, používanými v PDT?

Odpověď:

Literatura udává množství NP související s PDT, protože mají určité výhodné vlastnosti: vysoký poměr povrchu a objemu, zabraňují předčasnému uvolnění PS, případně inaktivaci PS, propůjčují amfifilní charakter, upravují farmakokinetiku, vychytávání a mnoho dalších. Rozděluje je do skupin, kde působí jako přepravní mechanismy, napomáhají transferu energie nebo určitým způsobem napodobují chování PS (fulereny, TiO_2 , ZnO), dále podle toho zda jsou biodegradabilní (deriváty polyesteru, polyakrylamidu, liposomy, přírodní makromolekuly jako NP) nebo nedegradující (křemíkové, zlaté, magnetické). Na ÚLB byly testovány SPIO NP, avšak nebyla prokázána vyšší účinnost PDT. Studuje se nový kompozit na bázi uhlíku.

Dotaz:

V kapitole 2.3.1. je odkaz na zdroj literatury, která popisuje určité hroty. Jaké však byly použity ve Vašem konkrétním případě? Zde bych právě čekal nějaké aktuální informace vztahované k vlastní práci.

Odpověď:

Typ hrotu použitý při práci je uveden v kapitole 4.6, která představuje metody AFM použité v práci. Jednalo se o hrot DNP (Bruker, Si₃N₄) o nominální hodnotě konstanty tuhosti 0,12 N/m. Kapitoly 1 a 2 jsou teoretické kapitoly a předestírají jak široké a komplexní téma PDT a vyhodnocování účinku PDT pomocí mikroskopických metod je. Volba hrotu záleží vždy na konkrétní aplikaci a stále se nejvíce používají hroty z křemíku a nitridu křemíku, tuhost je pak dána povahou skenovaného vzorku.

Dotaz:

Může ovlivnit měření i například štíhlost hrotu?

Odpověď:

Měření to ovlivňuje minimálně, jelikož jsou měřené struktury takových rozměrů, že ovlivnění štíhlostí hrotu je zanedbatelné.

Dotaz:

V kapitole „Výsledky a diskuze“ na str. 56 je odkaz, že selektivita nádorové tkáně je poměr mezi koncentrací fotosenzitizéru v nádorové a okolní tkáni. Existují metody, které specifikují tento poměr?

Odpověď:

Tento poměr se velice těžko určuje, neboť je zde velké množství faktorů, které toto ovlivňují. Mezi ně patří například typ PS (hydrofilita, lipofilita), typ nádoru, jaký má uptake/clearence, proliferace, cévní zásobení. Díky fluorescenčním vlastnostem PS je lze využít i při diagnostice a lokalizaci. Pro kvantitativní určení látky se využívá především kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem. Jako další metodu je možné použít mikrodialýzu.

Dotaz:

Str. 59 – nevyčetl jsem zde, co tvoří statistický soubor. Kolik je to buněk, z kolika vzorků (kultivací) připravených za jakých podmínek. Případně, jak to ovlivní změna podmínek.

Odpověď:

Testy probíhaly vždy alespoň ze 3 nezávislých měření a podmínky jsou uváděny v kapitole 4. Materiál a metody, kdy pro experimenty s využitím mikroskopu atomárních sil byly použity speciální Petriho misky o průměru 50 mm se skleněným dnem WillCo. Do nich bylo vyseto 10⁵ buněk s 2 ml kultivačního média DMEM. Adheze buněk probíhala přes noc. Snímání buněk probíhalo při pokojové teplotě s čerstvě vyměněným kultivačním médiem. Pro navození fotodynamického efektu byly buňky inkubovány s PS po dobu 24 h ve tmě při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Po době inkubace byly buňky zbaveny neabsorbovaného sensitizéru a ozářeny dávkou 5 J/cm². Statistický soubor tvořilo vždy měření alespoň z 30 buněk. Pro

vyhodnocení Youngova modulu bylo vyhodnoceno semiautomaticky několik tisíc silových křivek na jednu sadu buněk – např. kontrola.

Poznámka doc.RNDr. Roman Kubínek, CSc.:

Výše uvedené skutečnosti bych zařadil do disertační práce.

Dotaz:

Str. 65₁₂ Zmínka, že „silové křivky jsou vyhodnocovány pomocí mnoha modelů“ navozuje dotaz, jaké to byly modely, které byly použity při konkrétních experimentech, použitých v DP?

Odpověď:

Použitý model je uveden v kapitole 4 Materiál a metody, a byl použit Sneddonův model, který se pro buňky používá nejvíce. Představuje kužel vtlačovaný do povrchu, což představuje úkon, který vykonává hrot.

Dotaz:

Co znamenají výsledky získané z měření pro použité buňky a fotosenzitizéry? Který fotosenzitizér výrazněji ovlivní výsledky a které byly zahrnuty do statistických vyhodnocení. To by se mělo objevit v diskuzi.

Odpověď:

Všechny studované PS statisticky významně mění hodnoty mechanických vlastností. Z testů viability je nejúčinnější PS TMPyP. Je však třeba brát v potaz, že jeden sensitizér není vhodný pro všechny druhy nádorů. Celková farmakokinetika je ovlivněna řadou fyzikálních a fyziologických faktorů, např. fyzikálně-chemické vlastnosti PS (náboj, lipofilita), cévní zásobení a metabolismus cílové tkáně, intenzita ozáření. Studované PS jsou studovány in vitro a jsou součástí základního výzkumu.

Dotaz:

Obr. 19 Prosím o popis obrázku 19. Jde o jeden typický obrázek? Jiné buňky mají podobné znaky?

Odpověď:

Ano, jedná se o typický obrázek a ostatní buňky vykazují podobné znaky. Díky zobrazovacímu módu, který interaguje nejen s povrchovými, ale i podpovrchovými strukturami, předpokládáme, že se jedná o aktinová vlákna, jejichž reorganizaci lze sledovat i v konfokálním mikroskopu.

Dotaz:

Nemohli bychom tedy stejnou oblast porovnat s výsledky z konfokální mikroskopie?

Odpověď:

Ano lze to. AFM dokáže kombinovat AFM obraz s fluorescenčním. Avšak při AFM analýze byly měřeny živé buňky v médiu. Pro konfokální mikroskopii bychom tyto buňky museli zafixovat, tudíž usmrtit. Z tohoto důvodu by vzorky byly porovnatelné jen obtížně.

Dotaz:

Jak se mění jevy při F-d spektroskopii v porovnání v médiu a na vzduchu?

Odpověď:

Dochází ke změně zastoupení působících sil. Např. kapilární síly, které se projevují u měření na vzduchu, v kapalině mizí. Na křivce získané v kapalině se objevují fluktuace (vyšší šum), které jsou nejspíše způsobeny interakcí samotného nosníku s kapalinou. Pro práci je nejdůležitější sklon stoupající části křivky, která určuje tuhost materiálu. Tu nejvíce ovlivňuje tuhost nosníku a kalibrace.

Dotaz:

Obr. 20 je výsledkem jen jednoho měření?

Odpověď:

Obr. 20 představuje výstup ze zobrazovacího módu PF QNM, který nabízí vyhodnocení více parametrů, než jen topografické zobrazení buňky. PF QNM představuje online analýzu křivek získaných v módu PeakForce Tapping.

Dotaz:

Závěr: zde jsem nepochopil, jak je provázán „odhad“ mechanických vlastností buněk s účinností PDT. Co bylo Vaším osobním přínosem a zjištěním? Jaký významný výsledek práce přinesla?

Odpověď:

Odhad mechanických vlastností znamená, že v současnosti neexistuje žádný standard, který by jasně definoval hodnotu YM pro jednotlivé buněčné linie. Mým přínosem bylo zobrazení změn vyvolaných PDT metodou, která v oblasti PDT nebyla využívána, a přidal jsem tak střípek do mozaiky znalostí ohledně PDT. A také, že jsem na ÚLB zavedl další metodu pro hodnocení vlivu PDT.

Dotazy a odpovědi v rámci diskuze

1) doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.

Otázka:

Skenování samotného obrazu trvalo poměrně dlouhou dobu cca 40 minut. Je nutné dodržet tento čas? Nedochází k poškození buněk?

Odpověď:

Buňky mohou být skenovány po dobu max. 3 - 4 hodin, tudíž je doba 40 minut stále v časovém rozmezí. Navíc, abychom dosáhli lepšího rozlišení a vyvarovali se artefaktů, je vhodnější volit menší rychlosti skenování.

2) doc. RNDr. Jiřina Škorpíková, CSc.

Otázka:

Nemůže se v průběhu skenování hrot opotřebovat a tudíž dávat jiné výsledky? Dochází k výměnám hrotů v průběhu experimentu?

Odpověď:

Hroty jsou měněny po každém ukončeném experimentu, aby se zajistily konzistentní výsledky, měřené jedním hrotem.

3) doc. Ing. Josef Hanuš, CSc.

Otázka:

Má tedy vliv na kvalitu a citlivost skenování raménko? Popř. jaká je míra ovlivnění měření v porovnání s hrotem? Je zde závislost na materiálu, ze kterého je hrot vyroben?

Odpověď:

V případě našeho měření materiálová závislost nehraje roli, jako je tomu možné v jiných oborech využívajících AFM (např. elektrochemie, atd.). Procentuální zastoupení vlivu hrotu a nosníku na měření nelze jednoznačně určit, neboť se jedná o komplexní systém. Hrot má vliv na jemnost detailů zobrazeného vzorku a nosník na velikost minimální interakce. Pro měkké vzorky není možné použít tuhý nosník, protože by jej poškodil.