



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 23. června 2021

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská biofyzika

Mgr. Zuzana Malá, vědecká pracovnice Katedry fyziky UK Hradec Králové, studentka prezenční formy doktorského studijního programu *Lékařská biofyzika* na LF UP v

Téma práce: „Nanomateriály a studium účinnosti fotodynamické reakce na bakteriálních kmenech“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 23. června 2021 v 10:30 hod.

Komise:

předseda: doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková, Ph.D. ✓

místopředseda: doc. Ing. Josef Hanuš, CSc. ✓

členové: MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D. ✓

Mgr. Jaromír Vachutka, Ph.D. ✓

doc. Mgr. Vladan Bernard, Ph.D. ✓

Oponenti:

Mgr. Šárka Hradilová, Ph.D. ✓
RCPTM UP

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

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

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo 5 členů komise. Kladně hlasovalo 5 členů, záporně 0 členů, neplatných lístků bylo odevzdáno 0.

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Zuzana Malá** obhájila/~~neobhájila~~* disertační práci a doporučili/~~nedoporučili~~* udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková, Ph.D.
předsedkyně komise

*nehodící se škrtněte

Zápis z průběhu diskuze obhajoby disertační práce Mgr. Zuzany Malé

Název práce: „**Nanomateriály a studium účinnosti fotodynamické reakce na bakteriálních kmenech**“

Oponenti: Mgr. Vladan Bernard, Ph.D., Mgr. Šárka Hradilová, Ph.D.

Odpovědi na dotazy oponentů

Mgr. Vladan Bernard, Ph.D.

Dotazy:

Prosím o komentář a vyjádření se ke všem jednotlivým cílům práce definovaných v kapitole 11. v souhrnné stručné formě.

Cíle práce:

- ověřit účinek antimikrobiální fotodynamické inaktivace na Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriálních kmenech

Odpověď: Gram-pozitivní bakteriální kmeny jsou více senzitivní k aPDI než Gram-negativní kmeny. Rozdílná buněčná stěna Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií. Buněčná stěna Gram-pozitivních bakterií je poměrně jednoduchá. Obsahuje vysoké množství peptidoglykanu a kyseliny teichové. Bakterie navíc nemají žádnou vnější buněčnou membránu. Gram-negativní bakterie mají složitější buněčnou stěnu. Stěna se skládá z vnější a vnitřní membrány oddělené periplazmatickým prostorem s tenkým peptidoglykanem vrstva. Vnější buněčnou membránu tvoří dvě lipidové dvojvrstvy obsahující fosfolipidy, sacharidy a proteiny.

- stanovit optimální parametry fotodynamické reakce aplikované na bakteriální kmeny

Odpověď: Záleží na daném typu bakteriálního kmene. Dále záleží na typu použitého fotosenzitizéru a použité koncentraci. Záleží na intenzitě ozáření. Optimální parametry byly stanoveny pro jednotlivé bakterie a daný fotosenzitizér.

- stanovit optimální parametry fotodynamické reakce v kombinaci s nanočásticemi stříbra
ověřit synergický efekt kombinace aPDI a nanočástic stříbra

Odpověď: Kombinace aPDI s AgNPs – snížení minimálních inhibičních koncentrací – synergický efekt. Minimální inhibiční koncentrace AgNPs byla 3,38 mg/l. Synergický efekt pro Meticilin-rezistentní *S. aureus*: inkubace 45 min, 10 J/cm², koncentrace TMPyP: 1,56 – 25 μM, koncentrace AgNPs: 3,38 mg/l. Delší inkubace nebo delší ozáření – nižší koncentrace TMPyP. Synergický efekt pro *K. pneumoniae* produkující širokospektré β-laktamázy: inkubace 45 min, 10 J/cm², koncentrace TMPyP: 1,56 –

50 μM , koncentrace AgNPs: 3,38 mg/l. Delší inkubace nebo delší ozáření – nižší koncentrace TMPyP.

- ověřit antimikrobiální vlastnosti TPP-NPs na Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriálních kmenech.

Odpověď: Gram-pozitivní bakteriální kmeny: aPDI zprostředkovaná pomocí TPP-NPs je vysoce účinná proti MRSA a *E. faecalis*. Již po 0,5 min světelné expozici ($1,62 \text{ J/cm}^2$) se počet kolonií snížil o 2 log CFU/ml vůči kontrole.

Gram-negativní bakteriální kmeny: nebyla pozorována významná redukce po 0,5 min světelné expozici. *P. aeruginosa* – snížení počtu kolonií až po 5 min světelné expozici. *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy- nebyla zaznamenána žádná inhibice růstu.

- ověřit možnosti použití kurkumínu v aplikaci aPDI

Odpověď: Byla pozorována redukce bakteriálních kolonií po aplikaci aPDI s kurkumínem. Z důvodu nestability kurkumínu v čase je nutné jej stabilizovat. Jako jedna z možností je navázání na PLGA mikročástice. Byla pozorována redukce bakterií o 20% vůči kontrole po aplikaci aPDI s PLGA-CUR.

Mgr. Šárka Hradilová, Ph.D.

Dotazy:

Jakým způsobem byly vybírány bakteriální kmeny ke studiu účinku fotosensitizerů? Proč jste vybrala konkrétně tyto kmeny?

Odpověď: Meticilin rezistentní *S. aureus* CCM 4591 – rezistentní kmen, problém při léčbě v nemocnicích, může vést až ke smrti. *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy CCM 2486 – rezistentní k některým antibiotikům, častý výskyt v nemocnicích. *P. aeruginosa* CCM 3955, *E. faecalis* CCM 4224 – citlivé referenční kmeny. Výběr bakteriálních kmenů byl konzultován a doporučen od kolegů z ústavu mikrobiologie.

Proč nebyly u všech 3 skupin látek použity stejné testy?

Odpověď: Každá studie se zabývala trochu něčím jiným. Kombinace TMPyP a AgNPs – zajímal nás především jejich synergický účinek. TPP-NPs – zde již byl fotosensitizer navázaný na NPs. PLGA-CUR – pilotní studie na univerzitě v Miláně, kurkumín byl rovnou navázaný na MPs, při samotném použití kurkumínu jsme naráželi na problém s jeho stabilitou.

Proč nebyly pomocí AFM charakterizovány všechny NP-PS systémy?

Odpověď: Každá látka byla studována v jinou dobu, u každé látky byl trochu jiný pracovní postup. AFM studie byla provedena na vybraných NP-PS systémech. Studie TMPyP a AgNPs – studium synergického efektu, inaktivace byla zřejmá, AFM ověření nebylo nutné. Studie PLGA-CUR – byla provedena v rámci stáže v Miláně, zde nebylo možné měřit na AFM, transport vzorků z Milána do Olomouce nebyl možný.

Obr. 15 - 18 AFM - jak si vysvětlujete zmenšení těla bakterií po terapii? A co jsou ta malá kolečka v okolí kolonie bakterií? Měřítka je stejné, došlo k totálnímu rozbití bakteriální struktury?

Odpověď: Zmenšení bakterií: rozrušení buněčné stěny, vylití obsahu. Malá kolečka jsou s největší pravděpodobností agarová vrstva, kterou byla ošetřena skla, na které byly následně nanášeny bakteriální suspenze.

Jaké vlnové délky (jaká absorpční maxima) jsou obecně lepší a účinnější pro aPDT?

Odpověď: Pro PDT se častěji využívá červené světlo o vlnové délce 635 nm – lepší penetrace světla do tkáně. Modré světlo – menší průnik do tkáně, lepší pro léčbu povrchových nádorů, bakteriálních infekcí na povrchu.

Proč byla při ozařování kurkumínu s PLGA použita LED lampa emitující viditelné záření, když u ostatních PS-NP systémů byl použit LED ozařovač s přesnou vlnovou délkou?

Odpověď: Studie antimikrobiálních vlastností PLGA-CUR byla sledována v rámci půlroční stáže na Milánské univerzitě. Využívaly jsme zázemí a možnosti, které nám univerzita nabízela.

Jak lze stanovit přesnou dávku záření při použití "širokého" spektra záření jako je VIS v porovnání s přesnou vlnovou délkou LED zářiče, které předpokládám, mají odchylku $\pm 20\text{nm}$? Zkoušeli jste, jestli budou ostatní systémy také fungovat při použití této lampy? Který z použitých ozařovačů je vhodnější a proč?

Odpověď: Přesnou dávku můžeme dopočítat podle vztahu: $E = P \cdot t$, P...intenzita ozáření, t...čas. Ostatní systémy jsme touto lampou neozařovaly. Vhodnějším ozařovačem je LED zářič s přesně definovanou vlnovou délkou, u kterého jsme následně po změření jeho intenzity schopni dopočítat hustotu světelné energie.

Uvádíte, že se aPDI jeví jako vhodná alternativa k antibiotické léčbě, jak by to probíhalo konkrétně u pacienta postiženého infekcí?

Odpověď: Záleželo by na konkrétní aplikaci. Při povrchové aplikaci – kožní popáleniny, infekce kůže, zubů by byl fotosensitizer aplikován na postižené místo a to by bylo následně ozářeno viditelným zářením o vhodné vlnové délce.

Vědecká rozprava – další dotazy:

Mgr. Jaromír Vachutka, Ph.D.:

Otázka: Uvádíte, že stříbrné Ag byly používány po dobu několik století, ale vlivem používání antibiotik došlo ke snížení jejich používání. Jaké aplikace to byly? V jaké formě bylo stříbro, jednalo se o stříbrné nanočástice?

Odpověď: Obecně to bylo samotné stříbro, stříbrné nádoby, přístroje, k desinfekci jídla a dokonce šlechta upíjela roztoky stříbra za účelem ochrany před infekcí.

Otázka: AgNPS se používají dnes v mnoha odvětvích, jak je to s jejich toxicitou?

Odpověď: To použití není tak enormní aby to pro nás mělo nějaké vážnější dopady.

Otázka: Takže se někde akumulují?

Odpověď: Ano, ale pomocí různých filtrů lze nanočástice stříbra zachytit, aby se nedostaly do okolí.

doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková, Ph.D.:

Chtěla bych dodat: Ag není v těle zadržováno, po nějaké době je vyloučeno z těla ven.

Otázka: Prováděli jste i tmavé kontroly bez ozáření?

Odpověď: ANO, prováděli

Otázka: Ozařovaly se bakterie i samotné bez fotosenzitizéru?

Odpověď: Testovali jsme i samotné bakterie bez ozáření, i s ozářením – to mělo malý vliv

Otázka: Jak bakterie snášely modré světlo? Pokud vím, je pro ně poměrně toxické samo o sobě.

Odpověď: Byl pozorován malý vliv modrého světla na růst. Záleželo na různých podmínkách – počasí, světlo, atd.

doc. Ing. Josef Hanuš, CSc.:

Otázka: Zmínili jste použití techniky AFM a silikonový hrot. Je to technická otázka, ale zajímá mě, jestli materiál toho hrotu má vliv na vaše vzorky.

Odpověď: Použili jsme doporučený hrot pro tuto metodu. Výběr vhodného hrotu byl konzultován s kolegou, který práci prováděl.

Doc. Ing. Kateřina Bartoň Tománková, Ph.D.: To bylo špatně pochopeno, ten hrot byl křemíkový, ne silikonový.

Otázka: To co jste zde pospala, bylo už někdy použito na pacientech?

Odpověď: ANO, k léčbě bércových vředů. Doc. Mosinger z Prahy má k tomu i mnohé publikace.

Otázka: Platí to pojišťovna?

Odpověď: Myslím, že ne, ale nejsem si jistá.

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

Otázka: Jak to v té Praze ozařují?

Odpověď: Myslím, že tam mají lampu, ale možná je to už jinak než před 3 lety. Pro ozařování mají optický stůl, používají i různé optické filtry pro odstínění nežádoucího světla.