



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 20. února 2019

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská biofyzika

Mgr. Jana Jiravová, vědecká pracovnice Ústavu lékařské biofyziky LF UP, studentka prezenční formy doktorského studijního programu *Lékařská biofyzika* na LF UP v Olomouci

Téma práce: „**Studium vlastností nanomateriálů pro biologické aplikace moderními mikroskopickými technikami**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 20. února 2019 v 10:00 hod.

Komise:

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

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

členové: prof. Ing. Jan Hálek, CSc. OKLUZEN

doc. RNDr. Jiřina Škorpíková, CSc. ✓

MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D. ✓

Oponenti:

doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D. ✓
Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP v Olomouci

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

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

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího 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 4... členů komise. Kladně hlasovalo 4... členů, záporně 0... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno 0...

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Jana Jiravová** obhájila 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 Mgr. Jany Jiravové

Název práce:

„Studium vlastností nanomateriálů pro biologické aplikace moderními mikroskopickými technikami“.

Oponenti:

Doc. Mgr. Jitka Vostálová, Ph.D., Mgr. Vladan Bernard, Ph.D.

Posudek k disertační práci – doc. Mgr. Jitka Vostálová, Ph.D

Dotazy:

- 1) V úvodu bych uvítala zmínění obecných vlastností nanočástic, znalosti o jejich vstupu do buněk, případně do organismu, protože píšete jen o vstupu nanočástic odvozených od stříbra. U ostatních nanočástic neznáme, jak vstupují do buněk?
- Odpověď: U všech NP jsou obecné mechanismy jejich vstupu do buněk obdobné. Konkrétní způsob transportu však vždy závisí na vlastnostech NP (velikosti, tvaru, povrchu, reaktivitě) a typu buněk. NP mohou do buněk tedy pronikat nespecificky pasivním transportem nebo endocytózou.

Dodatečná otázka: Je tedy difúze častá nebo je spíše minoritní?

Odpověď: Záleží na konkrétním typu nanočástic a buněčné linii.

- 2) Uvádíte, že nanotrubice snadno prostupují membránou. Mohla byste vysvětlit/popsat, jak k tomuto průniku dochází?
- Odpověď: Názory na způsob transportu nanotubic do buněk se liší. V některých studiích byl popsán pouze pasivní transport bez přítomnosti endocytózy, jiné literární zdroje uvádějí opak. V rámci disertační práce byl snadný vstup do buněk zmíněn v souvislosti s jejich využitím k cílenému řízenému transportu látek do buněk způsobem nanoinjekce s minimálním poškozením membrány. K tomuto účelu jsou nanotrubice zvláště vhodné díky jejich tvaru, velikosti a schopnosti navázat transportované látky.

- 3) Na str. 62 uvádíte, že dochází k vezikulárnímu transportu. Mohla byste tento typ transportu popsat?

Odpověď: Jde o typ aktivního transportu založeného na tvorbě vezikul, které vznikají oddělením plazmatické membrány. V disertační práci je zmíněna pravděpodobná endocytóza NP na základě výsledků Ramanovy spektroskopie. Nicméně konkrétní typ endocytózy nebylo možné identifikovat použitými metodami.

- 4) V experimentální části jsou nedostatečně popsány experimenty a na základě uvedených informací by nebylo možné experimenty zopakovat. Např. není uvedeno jaké koncentrace nanočástic byly použity v experimentech, složení roztoků nebo co bylo použito v experimentech jako Ag^+ ? U metod použitých pro charakterizaci nanočástic jsou u TEM a AFM popsány experimentální podmínky, u metody DLS ne.

- Odpověď: Koncentrace NP není uvedena u metod týkajících se penetrace NP do buněk. Zde byla většinou použita koncentrace IC50 (viz. následující otázka). Jako zdroj Ag^+ byl použit roztok AgNO_3 (Sigma-Aldrich). Metoda DLS nevyžaduje speciální přípravu vzorku. Standardně jsou vzorky ředěny na koncentraci 10 mg/l a měřeny v kyvetě o objemu 1 ml.

Dodatečná otázka: Jaká byla koncentrace v zásobních roztocích?

Odpověď: Koncentrace zásobních roztoků je uvedena v tabulce v prezentaci.

- 5) K čemu byla vztažena penetrace nanočástic do buněk? Byla provedena koncentrační závislost penetrace nanočástic do buněk (např. při dvou různých koncentracích)?

Nejprve byly provedeny experimenty s koncentrací IC50. Následně u některých vzorků došlo v případě Ramanovy spektroskopie k ředění pro optimální zobrazení. Jednalo se především o vzorky oxidu titaničitého, kdy docházelo k nedostatečnému odstranění zbytků NP z povrchu buněk bez jejich poškození. Koncentrační závislost tedy provedena nebyla, zajímala nás spíše časová závislost k určení vhodné inkubační doby.

- 6) Proč nejsou uvedeny výsledky metod morfologické charakterizace (AFM, TEM, DLS a UV-VIS) všech testovaných nanočástic?

Všechny NP nebyly testovány ve stejném časovém horizontu. Nejprve byly provedeny experimenty s komerčními vzorky, kdy byla použita k charakterizaci pouze AFM a DLS. Následně byly testovány syntetizované NP a metody charakterizace byly rozšířeny o TEM a UV-VIS.

Dodatečná otázka: Uvažujete o charakterizaci dalšími metodami?

Odpověď: Pokud budeme pokračovat ve studiu NP, samozřejmě se pokusíme metodiku rozšířit.

7) Proč není stanovena/uvedena IC50 pro všechny testované nanočástice na všech typech buněk?

Nejedná se o komplexní studii, kde by byly všechny typy NP testovány na všech buněčných liniích. Jak se prohlubovaly naše znalosti o NP, které jsme měli možnost studovat, tak nás zajímaly pouze určité typy testů na některých buněčných liniích. Navíc některé vzorky jsme měli k dispozici jen v omezeném množství.

8) Popis osy Y v obr. 39 a 40 je zavádějící. Jaký byl celkový počet buněk při analýze?

Přestože byla u všech buněk použita koncentrace IC50, jejich celkový počet se mírně lišil, proto bylo celkové srovnání provedeno pomocí procentuálního zastoupení (kontrola = 100%). Byl tedy hodnocen nárůst apoptózy/nekrózy vůči kontrole.

9) Nanočástice jsou relativně málo stabilní a může docházet k časově závislé tvorbě agregátů, a proto se využívá ke zvýšení jejich stability různých derivací. Víte, jak dlouho před experimentem byly nanočástice Vámi používané připraveny? Je výrobcem deklarována doba použitelnosti, tedy garance, že nanočástice mají nezměněné vlastnosti v daném období?

Informace o NP od výrobce byly neúplné (viz. tabulka v prezentaci). Datum přípravy a informace o stabilizaci byly uvedeny pouze u některých vzorků, doba použitelnosti u žádného. Práce chtěla upozornit právě na nedostatečnou specifikaci NP, které jsou dostupné na trhu.

10) Který výsledek či jaké závěry získané v průběhu Vašeho doktorského studia jsou nejzajímavější a kterých výsledků si nejvíce ceníte?

Nejvíce si cením toho, že jsem mohla pracovat s moderními mikroskopickými a spektroskopickými technikami. Za významné považuji zavedení Ramanovy spektroskopie jako metody vhodné k detekci penetrace NP do buněk a jejich lokalizace v intracelulárním prostředí. Nicméně důležité a alarmující jsou především výsledky kometové analýzy, které prokázaly u některých vzorků značné poškození DNA. Přesto jsou NP Ag a NP TiO₂ nejčastěji aplikovanými nanomateriály, včetně výrobků pro děti.

Posudek k disertační práci - Mgr. Vladan Bernard, Ph.D.

- 1) Otázka: Prosím o srovnání velikosti jednotlivých analyzovaných nanočástic metodou AFM a DLS (kapitola 7.1 a 7.2) a objasnění případné nekonzistence výsledků.**

Odpověď: Průměrná velikost NP byla vždy vyšší při měření metodou DLS. Příčinou nekonzistence výsledků může být rozdílná příprava vzorku (AFM – 15 μ l vzorku, větší ředění, vysušení, velikost skenů 5x5 μ m, DLS – 1 ml, měřeno v roztoku). U metody DLS mohlo také dojít ke zkreslení velikosti NP z důvodu nesférického tvaru agregátů NP.

- 2) Na straně 62 je uvedena domněnka o vezikulárním transportu nanočástic. Prosím o rozvedení této domněnky, případně uvedení skutečností, které k vyslovení této domněnky vedly.**

Odpověď: K domněnce o vezikulárním transportu NP nás vedla přítomnost aglomerátů NP nejen uvnitř buněk, ale také v oblasti buněčné membrány (výsledky Ramanovy spektroskopie). Dle dostupné literatury se v takovém případě pravděpodobně jedná o vezikulární transport.

Další dotazy a připomínky z diskuze

doc. RNDr. Jiřina Škorpíková, CSc.

Otázka: Jak se dají využít znalosti, které jste získala v běžné praxi? Pozorujete například koncentrace nanočástic v běžně dostupných výrobcích např. opalovacích krémech?

Odpověď: Co se týče opalovacích krémů, tak kůže má přirozenou schopnost průniku do těla zabránit, nicméně problém by mohl nastat v případě poranění kůže. Dále je problémem akumulace v prostředí, jelikož naše výsledky naznačují, že některé nanočástice pravděpodobně způsobují poškození DNA a tudíž mají potenciálně genotoxický charakter.

doc. Ing. Josef Hanuš, CSc.

Otázka: Jaké jsou tedy ochranné mechanismy kůže, které zamezují průniku do buněk? Myslíte si, že mají buňky mechanismy pro vyplavení nanočástic?

Odpověď: Kůže má vrstvu keratinocytů, které vytvářejí lipofilní nepropustnou bariéru. Svrchní část pokožky navíc tvoří odumřelé kožní buňky, takže při zasažení nějakou exogenní látkou se tato vrstva buněk odloupne a je nahrazena novou.

doc. Mgr. Jitka Vostálová, Ph.D

Otázka: S jakými typy buněk jste pracovala? Byly do experimentů zahrnuty buňky, které se v kůži vyskytují?

Odpověď: V práci byly použity buněčné linie BJ (lidské fibroblasty), NIH3T3 (myší fibroblasty) a SVK14 (lidské keratinocyty). Keratinocyty se v kůži vyskytují.