

Oponentský posudek na disertační práci

Mgr. Jany Jiravové

Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

na téma

„Studium vlastností nanomateriálů pro biologické aplikace moderními mikroskopickými technikami“

Téma práce je aktuální. S nanomateriály se stále hojněji setkáváme v každodenním životě, aniž bychom si to uvědomovali. Znalost jejich účinků na organismus by ale měla být studována a známa ještě před jejich praktickou aplikací. Také by se neměl opomíjet jejich efekt na organismus při dlouhodobém a opakovaném používání, který může být spojen s jejich akumulací v těle, ale i v životním prostředí.

Práce se zabývá fyzikálně chemickými a biologickými vlastnostmi nanomateriálů stříbra a oxidu titaničitého. Jeden nanomateriál byl připraven na spolupracujícím pracovišti (Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci), ostatní testované nanomateriály byly získány od výrobců.

Předkládaná práce je členěna standardním způsobem. Úvod se věnuje obecně nanočásticím z různých kovů, oxidů kovů, nanočásticím na bázi uhlíku a metodám, které jsou vhodné pro zjištění morfologických vlastností. Poslední část úvodu se stručně věnuje buněčnému poškození a některým vybraným metodám, které se využívají k jeho monitorování. Následují jasné formulované cíle, experimentální část, výsledky a poměrně stručná diskuze se závěrem.

K předložené práci se vztahují 3 publikace v časopisech s IF, kde u jedné je předkladatelka první autorkou. První autorkou je také u kapitoly v monografii. Dále je spoluautorkou 4 článků publikovaných v časopisech s IF, které se přímo nevztahují k tématu disertační práce.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

- 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?
- Zbytečně se věnujete nanočásticím a strukturám nanočástic, které nebyly předmětem Vašeho studia.
- Uvádíte, že nanotrubice snadno prostupují membránou. Mohla byste vysvětlit/popsat, jak k tomuto průniku dochází?
- Na str. 62. uvádíte, že dochází k vezikulárnímu transportu. Mohla byste tento typ transportu popsat?
- 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.

- Popis testovaných nanočástic je nepřehledný, bylo by lepší shrnout informace o jejich původu a vlastnostech např. do tabulky.
- Otáčky při centrifugaci by bylo vhodnější uvádět jako RCF.
- K čemu byla vztažena penetrace nanočástic do buněk? Byla provedena koncentrační závislost penetrace nanočástic do buněk (např. při dvou různých koncentracích)?
- Proč nejsou uvedeny výsledky metod morfologické charakterizace (AFM, TEM, DLS a UV-VIS) všech testovaných nanočástic?
- Proč není stanovena/uvedena IC_{50} pro všechny testované nanočástice na všech typech buněk?
- Popis osy Y v obr. 39 a 40 je zavádějící. Jaký byl celkový počet buněk při analýze?
- V disertační práci je prezentováno značné množství výsledků. Pro větší přehlednost a snazší orientaci ve výsledcích by bylo vhodné prezentovat výsledky získané na jednom parametru, případně na jednom typu buněk pro všechny studované nanočástice včetně Ag^+ současně.
- Škoda, že nejsou prezentovány výsledky produkce ROS testovaných nanočástic stříbra ve společném obrázku, aby se snadněji porovnály jejich prooxidační vlastnosti.
- V literatuře je velké množství chyb, překlepů a nejednotný styl.
- Nanočástice jsou relativně málo stabilní a může docházet k časově závislé tvorbě agregátů, a proto se využívá ke zvýšení jejich stability různých derivatizací. 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?
- Který výsledek či jaké závěry získané v průběhu Vašeho doktorského studia jsou nejzajímavější a kterých výsledků si nejvíce ceníte?

V průběhu studia Mgr. Jana Jiravová zvládla celou řadu experimentálních technik a postupů, získala velké množství nových poznatků a informací o nanočásticích. Své znalosti využila v plánování experimentů, v jejich následném zpracování, vyhodnocení experimentálních dat a v přípravě rukopisů. Dále rozšířila znalosti o studovaných nanomateriálech, které se jistě stanou podkladem dalšího výzkumu na Ústavu lékařské biofyziky.

I přes všechny uvedené připomínky předložená práce Mgr. Jany Jiravové splňuje požadavky kladené na studenta doktorského studia.

Na základě těchto skutečností doporučuji předloženou disertační práci k obhajobě a souhlasím s udělením akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci dne 14. ledna 2019

Doc. Mgr. Jitka Vostálová, Ph.D.

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

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Jany Jiravové

s názvem

STUDIUM VLASTNOSTÍ NANOMATERIÁLŮ PRO BIOLOGICKÉ APLIKACE MODERNÍMI MIKROSKOPICKÝMI TECHNIKAMI

Předložená práce k oponentuře autorky Mgr. Jany Jiravové se zabývá aspekty studia nanomateriálů a jejich interakcí s buněčnými liniemi s důrazem na možnost využití moderních mikroskopických metod k jejich hlubšímu popisu. Disertační práce má charakter uceleného textu doplněného originálními grafy a mikroskopickými obrazy. Práce má celkem 105 číslovaných stran textu včetně souhrnu citací a seznamu publikační aktivity autorky. Celá práce je členěna do 9 kapitol zahrnující potřebný teoretický úvod a popis současného stavu poznání v dané oblasti na základě literární rešerše, navazující kapitolu stanovující výzkumné cíle, kapitolu věnující se popisu použitého materiálu a metod, kapitolu shrnující výsledky, kapitolu obsahem věnující se diskuzi nad získanými výsledky a poslední kapitolu v podobě závěrečného hodnocení.

První kapitola je pojata jako úvod do světa nanomateriálů, definuje základní vlastnosti a parametry nanostruktur, historii a všeobecný původ nanočástic.

V druhé kapitole se autorka věnovala „přehledu nanočástic“ a jejich členění. Tato kapitola je dále členěna na podkapitolu o nanočásticích na bázi kovů obsahující informaci o stříbrných a zlatých nanočásticích a kvantových tečkách, podkapitolu o nanočásticích oxidů kovů s důrazem na nanočástice oxidu titaničitého a magnetické nanočástice, podkapitolu o nanočásticích na bázi uhlíku a poslední podkapitol věnovanou polymerním nanočásticím, zejména denrimerům.

Třetí kapitola v pořadí přináší informace získané rešerší na téma „metod charakterizace nanočástic“. V této kapitole je zpracována problematika využití elektronové mikroskopie, mikroskopie atomárních sil, Ramanovy spektroskopie, dynamického rozptylu světla a atomové absorpční spektrometrie. Následující kapitola „Studium buněčného poškození“ informuje čtenáře o možných stresových faktorech ovlivňujících buněčnou viabilitu.

V pořadí pátá kapitola „Cíle práce“ informuje čtenáře o vytyčených konkrétních cílech práce, které jsou v předloženém textu definovány jasně a jednoznačně.

V kapitole „Materiál a metody“ je na pěti stranách dostatečně podrobně probrán výčet použitých laboratorních a analytických metod, statistické hodnocení, použitý materiál, přístrojové vybavení i použité nanočástice.

Navazující 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 z mikroskopie atomárních sil, dynamického rozptylu světla, elektronové mikroskopie, Ramanovy spektroskopie, kvalitativní analýzy penetrace pomocí atomové absorpční spektrometrie, výsledky mitochondriálních testů životnosti, měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů, kometové analýzy a detekce apoptózy a nekrózy.

Předposlední kapitolou je „Diskuze“, v které jsou získaná data konfrontována s dostupnými daty a výsledky experimentů jiných výzkumných týmů. Autorka zde kompiluje jednotlivé dílčí výsledky ve vztahu k otázce interakce nanočástic se zvolenými buněčnými liniemi.

Poslední číslovanou kapitolou práce je „Závěr“ v rozsahu jedné strany, kde autorka stručně rozebírá přínos práce a poukazuje na rizika spojená s potencionální toxicitou nanočástic.

Seznam citací a použitých literárních zdrojů uvedený na konci disertační práce obsahuje přes 160 odkazů na relevantní výzkumné či souhrnné práce a 8 internetových odkazů. Výrazná část titulů ze seznamu citací tvoří recentní práce z posledních deseti let a mnoho z citovaných prací představuje významné základní práce z oboru. Majoritní zastoupení tvoří práce v anglickém jazyce, minoritní skupinu práce publikované v jazyce českém. V citačních zdrojích jsou zastoupeny až na výjimky periodika s impakt faktorem. Předložená práce je tak dobře zasazena do dnešního kontextu a reaguje na zcela aktuální výsledky výzkumu. V tomto ohledu nelze vznést jakýchkoliv námitek.

Po stránce stylistické a kvality textu je práce na dobré úrovni, byť několik drobných překlepů obsahuje. Drobnou výtku vznáším na kvalitu a formu vazby práce, kdy po několikerém listování dochází k uvolňování jednotlivých listů.

Po formální i obsahové stránce bych autorce vytknul či připomínkoval některé skutečnosti:

- 1) Chybějící číslování použitých vzorců v textu. Číslování vzorců v dokumentech prezentovaného typu bývá standardem a při jejich absenci působí text méně přehledně, zejména v případě jejich častějších citací. V případě prezentované práce jde o jediný vzorec na straně 41, viz další bod.
- 2) V práci jsou rozebírány analytické metody a laboratorní přístroje založené na čistě fyzikálním principu interakce a v celém textu je pro jejich popis použito pouze jednoho vzorce. Myslím, že práce tohoto zaměření a s ohledem na školící pracoviště by měla věnovat více prostoru jejich popisu ve smyslu fyzikálním, podpořeném základními vzorci vyjadřujícími daný princip interakce. Chápu ovšem, že tímto by se neúměrně zvýšil počet stran přesahující standardy práce tohoto druhu, což je spíše nežádoucí.
- 3) Připomínky mám k (pro mne) chaotickému označení použitých nanočástic v experimentech. Jde o pracovní názvy TiO₂, Nanorutil, KC Rulc 20, KC Rulc 14, Vintr, S9, S29. V prvních dvou případech jde o nanočástice oxidu titaničitého, v následujících o nanočástice Ag. Použité pracovní pojmenování toto však nenaznačuje a je nutné opakovaně nahlížet do kapitoly definující použitý materiál. Daná skutečnost nikterak nesnižuje kvalitu práce, pouze ztěžuje zběžnou orientaci v prezentovaných výsledcích.
- 4) V závěru mohlo být věnováno více důrazu na komentáře k jednotlivým vytyčeným cílům.

Přes uvedené drobné výtky hodnotím práci jako zdařilou a ve svém obsahu přínosnou. Autorka v praktické části prezentuje velké množství dat, za kterými se skrývá nespočet hodin v laboratoři a následně u softwarového zpracování. Považuji za vhodné také uvést poznámku o velkém objemu laboratorních metod, které bylo nutné si osvojit pro úspěšnou realizaci prezentovaného výzkumu.

Realizovaná studie má reálné opodstatnění, zejména s přihlédnutím k zvyšující se produkci nanočástic a jejich komerčnímu využití, ať už v oblasti kosmetiky a potravin na straně jedné či medicíny na straně druhé. Proto je zvolené téma z medicínského a společenského hlediska velmi aktuální.

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 jedna prvoautorsky. Soupis autorčiných publikačních činností také zahrnuje kapitolu v monografii a pět konferenčních abstraktů. Prezentovaná četná publikační aktivita autorky ukazuje na její vysokou orientaci v oblasti vědeckého zájmu.

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. Drobné připomínky uvedené v posudku jsou v akceptovatelné míře a nesnižují celkovou kvalitu předkládané disertace.

Předloženou disertační práci Mgr. Jany Jiravové „Studium vlastností nanomateriálů pro biologické aplikace moderními mikroskopickými technikami“ doporučuji k obhajobě pro udělení akademického titulu Ph.D. (podle §47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.)

Otázky k obhajobě:

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

V Brně dne 4.1.2019



Mgr. Vladan Bernard, Ph.D.