

Oponentský posudek disertační práce

Název: Studium účinků fotodynamicky aktivních látek s využitím moderních mikroskopických metod

Autor: Mgr. Jakub Malohlava

Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP, školitelka: doc. Ing. Kateřina Tománková, Ph.D.

Oponent: doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc.

Význam disertační práce pro příslušný obor

Disertační práce se věnuje hodnocení vlivu fotodynamicky aktivních látek pomocí moderních mikroskopických metod. K vyhodnocení fotodynamického účinku je využito metod konfokální mikroskopie a mikroskopie atomárních sil, ve spojení s metodami testování životnosti buněk. Disertační práce rozvíjí experimenty, které byly v oblasti fotodynamické terapie prováděny na pracovišti v předchozích letech, a jejich výzkum je významný pro léčbu nádorových onemocnění. Význam disertační práce pro oblast biomedicíny je tedy jednoznačný.

Vyjádření k postupu řešení problémů, použitým metodám a splnění stanoveného cíle

Cíle disertační práce jsou jednoznačně formulovány v úvodu experimentální části disertační práce. Cíle jsou zaměřeny na nosné téma celé práce, a to zavedení hodnocení buněčného poškození nádorových a nenádorových buněčných linií s využitím mikroskopických a fluorescenčních metod, hodnocení cytomechanických vlastností těchto linií s využitím AFM a ověření účinku PDT s využitím nově vyvíjených porfyrinových senzitizerů a ověření vlivu PDT na cytoskeletální vlastnosti linií nádorových a nenádorových buněk.

Vlastnímu experimentu je věnováno, včetně uvedení „materiálu a metod“ a „výsledků a diskuze“ 20 stran. Prvních 50 stran vcelku zbytečně obsáhle, zahrnuje teoretický popis. Některé výhrady uvádím v připomínkách v následujícím textu.

Deklarované cíle v úvodu práce jsou však postupně prezentovány a diskutovány. Považuji cíle disertační práce za částečně splněné. Závěry poukazují pouze na perspektivy použitých metod a, jak uvádí autor DP na „odhad mechanických vlastností buněk pomocí AFM, který se tak zdá být perspektivní metodou diagnostiky různých chorob“.

Stanovisko k výsledkům disertační práce a k původnímu přínosu disertanta

Pokud neberu v úvahu přehled použité literatury a úvodní strany DP, přibližně dvě třetiny disertační práce je věnována teoretickému popisu použitých metod a materiálů. Ke cti disertanta je třeba uvést, že popis vychází z poměrně rozsáhlého počtu 128 použitých literárních zdrojů a odkazy jsou propojovány jak s teorií, tak v diskuzi s dosaženými výsledky. Zde bych ale očekával větší podíl diskuze k vlastním experimentálním výsledkům. Výhrada by mohla zaznít k použití zdroje Kubínek, Vůjtek, Mašláň: Mikroskopie skenující sondou z roku 2003, který je vzhledem k dynamicky se rozvíjejícím metodám již vhodný jen pro výuku základů těchto metod. Autor DP používá moderní přístroj AFM pro biologické účely a mohl zaměřit svůj popis především k těmto aplikacím AFM.

Přestože autor disertační práce využíval tento přístroj i k jiným aplikacím na LF UP, nehodnotím část disertační práce zpracovanou v kapitole 6, protože nemá návaznost na vlastní cíle disertační práce.

Jak jsem již uvedl, původní experimentální část, kde by autor měl především využít prostor k popisu i vyhodnocení účinnosti metod je omezena na 20 stran, z čehož jsou 3 vyhrazeny pro popis materiálu a metod. Ve výsledcích, které diskutuje v části 5, jsou uváděna

statistická vyhodnocení, ale z textu není patrné na kolika vzorcích (či buňkách) byla statistika prováděna. Vlastní pozorování jsou dobře provázána s odkazy na poznatky jiných autorů, ale bez zjevného vyvození vlastního závěru, který by ozřejmil mechanismus buněčného poškození a účinnosti v reálných terapeutických postupech.

Formální úprava disertační práce, vyjádření k publikacím autora

Formální úprava disertační práce je uspokojivá, má minimum překlepů. Další připomínky a komentáře, případně otázky do diskuze:

- V souhrnu jsou uvedené použité mikroskopické metody – AFM a konfokální mikroskopie, ale bez zmínky k čemu byly pro řešení disertační práce nezbytné.
- 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?
- Str. 12₆ uvádí autor pojmy „anion“ a „kation“. Česky však jde o ionty, iony jsou takto uváděny ve slovenské literatuře.
- 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?
- Str. 32⁴ píše se zde, že obraz se tvoří promítnutím maxim a minim na sítnici. Tam se ale promítá již hotový obraz. Difrakční a interferenční obraz se vytváří v obrazové ohniskové rovině objektivu a je zdrojem sekundárního vlnění, které vytvoří v obrazové rovině (nebo na sítnici či detektoru) obraz. Většinou je okem pozorován v obrazové rovině virtuální obraz.
- Str. 32¹³ rozlišovací schopnost není vzdálenost dvou bodů.
- Kapitola „metody světelné mikroskopie“ mohla být klidně omezena jen na použitou konfokální mikroskopii.
- 34¹⁰ bylo by přesnější uvádět, že fázová destička se umístí do obrazové ohniskové roviny (zde se vytváří primární obraz).
- 35² nemusí jít jen o dvojlom, který je uváděn jako krystalová anizotropie.
- Na str. 38 kapitola 2.2.6. jde o super-rozlišení (i když chápu, proč je zde uvedena resoluce, nepovažuji to za správné).
- 40⁹ NSOM má využití evanescentních vln jako jednu z možností (je uvedeno dále v textu).
- 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 vztažené k vlastní práci.
- Str. 51. Pokud se zde uvádí artefakty při skenování, mělo by zaznít, jaké vznikaly při experimentu a jak byly odstraňovány.
- Str. 53¹⁷ mikroskop, který používáte, není transmisní, ale invertní.
- 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?
- 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.
- Str. 61 v odkazu na obr. 12 zahrnuje popis jednoho snímku. Při velké variabilitě podobných vzorků však budou obrázky určitě odlišné.
- Str. 63 obr. 13 a 14. Kolik buněk bylo takto pozorováno a za jakých podmínek? (viz. předchozí dotazy).

- 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?
- 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.
- Obr. 19 Prosím o popis obrázku 19. Jde o jeden typický obrázek? Jiné buňky mají podobné znaky?
- Dotaz do diskuze „jak se mění jevy při F-d spektroskopii v porovnání v médiu a na vzduchu?“
- Obr. 20 je výsledkem jen jednoho měření?

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?

Publikace disertanta splňují podle požadavků LF UP podmínku předložení disertační práce k obhajobě.

Závěrečné vyjádření

Disertační práce neobsahuje závažné nedostatky, které by ji bránily v předložení k obhajobě. Jako oponent ji **doporučuji k obhajobě** a po jejím úspěšném průběhu doporučuji udělení vědeckopedagogické hodnosti Ph.D. dle §47 Zákona o VŠ č. 111/98 Sb.

V Olomouci 2. 5. 2017

R

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

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Jakuba Malohlavy

s názvem

STUDIUM ÚČINKŮ FOTODYNAMICKY AKTIVNÍCH LÁTEK S VYUŽITÍM MODERNÍCH MIKROSKOPICKÝCH METOD

Předložená práce k oponentuře autora Mgr. Jakuba Malohlavy se zabývá aspekty studia fotodynamicky aktivních látek 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 97 stran textu včetně souhrnu citací a seznamu publikační aktivity autora. Celá práce je členěna do 7 kapitol zahrnující zejména potřebný teoretický úvod a popis současného stavu vědy v dané oblasti na základě literární rešerše, navazující kapitolu stanovující výzkumné cíle, kapitolu věnující se popisu použitého materiálu a metodám, kapitolu shrnující výsledky a diskuzi nad nimi, kapitolu obsahem věnující se dalšímu experimentálnímu pozorování a poslední kapitolu v podobě závěrečného hodnocení.

První i druhá kapitola se věnuje literární rešerši vázající se k tématu hodnocené disertační práce. Konkrétně jde o kapitoly s názvem „Fotodynamická terapie“ a „Mikroskopické techniky“. První kapitola se podrobně popisuje historii, princip a průběhu fotodynamické terapie. Dále zpracovává téma fotosensitizerů, zdrojů elektromagnetického záření a popisuje efekt fotodynamické terapie na buněčné úrovni. Druhá teoretická kapitola se zabývá mikroskopickými technikami a jejich historií. Součástí této kapitoly je rešerše věnující se podstatě světelné mikroskopie včetně metody fluorescenční, konfokální a super-resoluční. V další části je zpracováno téma mikroskopie atomárních sil včetně technik mikroskopie atomárních sil.

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

V kapitole „Materiál a metody“ jsou poměrně stručně sumarizovány použité chemikálie, fotosensitizéry, buněčné linie a laboratorní výzkumné metody. Mezi jmenované metody patří technika testů buněčné cytotoxicity MTT, metody fluorescenčního barvení, mikroskopická metoda atomárních sil a přehled statistického vyhodnocení dat.

Navazující kapitola „Výsledky a diskuze“ hodnotí vliv fotodynamicky aktivních látek na zvolené buněčné linie a konfrontuje je s výsledky jiných autorů. Tato kapitola není dále členěna na nižší celky a výsledky jsou prezentovány v souvislém nestrukturovaném textu.

Předposlední kapitola textu práce „Další pozorování pomocí mikroskopie atomárních sil na Ústavu lékařské biofyziky, LF UP v Olomouci“ se věnuje technice mikroskopie atomárních sil a prezentuje výsledky dalších mikroskopických pozorování autora – studium polymerních filmů kyseliny hyaluronové, charakterizaci Ni-Ti endodontických nástrojů, studium bakterií, studium nanočástic stříbra, studium nanočástic oxidu titaničitého, vazebné síly a adheze.

Poslední číslovanou kapitolou práce je „Závěr“ v rozsahu jedné strany.

Seznam citací a použitých literárních zdrojů uvedený na konci disertační práce obsahuje 121 odkazů na relevantní práce a 18 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 či případně alespoň odborně recenzovaná. 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 úrovně a kvality textu lze mít k práci snad pouze drobné výhrady v podobě několika málo překlepů.

Po formální i obsahové stránce bych autorovy 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.
- 2) Nejednotnost v použitých fyzikálních jednotkách. V textu na straně 45 je v jedné větě při popisu rozlišení použité metody použito různých délkových jednotek – nm pro laterální a Å pro vertikální. Toto může na čtenáře působit rušivě a znesnadňovat rychlé porovnání údajů.
- 3) Členění do podkapitol. Tato připomínka se týká kapitoly „Výsledky a diskuze“, která je celá koncipována jako jednolitý text doplněný grafy či mikroskopickými obrazy. Shledávám vhodnější

tuto kapitolu dále členit do podkapitol (zejména výsledkovou část) ve spojitosti s vytyčenými experimentálními cíli, čímž by byla čtenáři přehlednější.

- 4) Podle mého názoru je v prvních kapitolách věnován zbytečně velký prostor přehledu různých fotosensitizerů, přičemž použity experimentálně byly pouze zástupci jedné skupiny z celého spektra jmenovaných a detailně popisovaných. Na druhou stranu v práci postrádám hlubší fyzikální popis v textu rozebíraných jevů a pojmů – např. jev excitace a kvantový přenos energií či vztah mezi teplotou a emisním spektrem. Tato připomínka ale musí být brána s jistou rezervou, úvodní teoretický text jako celek i přes osobní názor nepůsobí rušivě ani nekompletně či nedostatečně.
- 5) Pozastavuji se také nad přítomností kapitoly 6. „Další pozorování pomocí mikroskopie atomárních sil na Ústavu lékařské biofyziky, LF UP v Olomouci“. Chápu, že reálným cílem autora bylo informovat čtenáře o svém dalším výzkumu realizovaném pomocí techniky mikroskopie atomárních sil a nešlo tedy o snahu uměle navýšit obsahový rozsah práce, avšak v daném případě a pozici zařazení kapitoly v textu práce působí tato kapitola bez výrazného kontextu k hlavnímu výzkumnému cíli disertační studie – tj. studiu účinků fotodynamicky aktivních látek. Poznámka se týká zejména podkapitol mikroskopické studie zubních rotačních nástrojů a studie metalických nanočástic, které kromě shodné mikroskopické techniky nenesou žádné propojení s nosným tématem disertační práce.
- 6) Drobné výhrady mám také k závěru, který mi připadá ne zcela dostatečně konzistentní s vyslovenými cíli práce, resp. ne všechny vytyčené cíle práce jsou v závěru dostatečně komentovány a hodnoceny. Celý text závěru je psán spíše povrchně a neadresně.

Přes některé výtky a zmíněné nedostatky přináší práce bezpochyby inovativní pohled na možnost použití fotosensitizerů a možnosti jejich studia. Především použití metody mikroskopie atomárních sil představuje nový náhled na možnosti studia buněčných linií, jejich cytomechanických vlastností a ověření si funkce nově vyvíjených sensitizerů v oblasti fotodynamické terapie. Realizovaná studie má reálné opodstatnění, zejména s přihlédnutím k zvyšujícím se případům nádorového onemocnění v lidské populaci. Každý nový příspěvek vedoucí k poznání mechanismu působení nově vyvíjených látek protinádorových léčiv umožní další postup k zlepšení péče o pacienty. 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 autorem publikovány v pěti původních vědeckých publikacích časopisů s IF, přičemž z toho jedna prvoautorsky. Mimo to obsahuje výčet autorových prací další čtyři spoluautorské původní vědecké práce publikované v časopise s IF a několik prací vázajících se k tématu publikovaných v recenzovaném časopise. Soupis autorových publikačních činností také zahrnuje dvě kapitoly v monografii a pět konferenčních abstraktů. Prezentovaná četná publikační aktivita autora ukazuje na jeho 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. Nedostatky uvedené v posudku jsou v akceptovatelné míře a nesnižují výrazně celkovou kvalitu předkládané disertace.

Předloženou disertační práci Mgr. Jakuba Malohlavy „Studium účinků fotodynamicky aktivních látek s využitím moderních mikroskopických metod“ doporučuji k obhajobě (podle §47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.)

Otázky k obhajobě:

- 1) 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?
- 2) Můžete celkově zhodnotit jednotlivé použité sensitizery 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)?

V Brně dne 12.5.2017



Mgr. Vladan Bernard, Ph.D.