

Oponentský posudek na disertační práci

Mgr. Zuzany Malé

Studijní program: Lékařská biofyzika

na téma

Nanomateriály a studium účinnosti fotodynamické reakce na bakteriálních kmenech

Předložená disertační práce je zaměřená na studium účinků fotodynamické terapie, především však na její aplikaci v oblasti mikrobiologie v podmínkách *in vitro*. Autorka studovala antimikrobiální fotodynamickou inaktivaci (aPDI) na Gram-pozitivních i Gram-negativních bakteriálních kmenech. Byla ověřena účinnost aPDI s použitím různých fotosensitizerů, jak komerčně dostupných, tak i nově vyvinutých.

Autorka si vytýčila následující cíle práce:

- ověřit účinek antimikrobiální fotodynamické inaktivace na Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriálních kmenech
- stanovit optimální parametry fotodynamické reakce aplikované na bakteriální kmeny
- stanovit optimální parametry fotodynamické reakce v kombinaci s nanočásticemi stříbra
- ověřit synergický efekt kombinace aPDI a nanočástic stříbra
- ověřit antimikrobiální vlastnosti TPP-NP na Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriálních kmenech.
- ověřit možnosti použití kurkumínu v aplikaci aPDI

Předložená práce o 99 stranách je standardně členěna do 15 kapitol, které zahrnují jak teoretický popis současného stavu vědy v dané oblasti, tak i výsledky vlastních experimentů autorky. Práce je podložena literární rešerší čítající 154 odkazů a zahrnuje také seznam publikační činnosti autorky.

Teoretická část se zaměřuje na vysvětlení principů fotodynamické terapie i antimikrobiální fotodynamické inaktivace (aPDI), jsou vysvětleny obecné principy, vlastnosti a klasifikace fotosensitizerů a zdrojů záření. Následující kapitoly se věnují bakteriím a jejich vnitřní struktuře a principům mikroskopie atomárních sil (AFM), která byla použita pro sledování morfologických změn bakterií před a po fototerapii.

V materiálové části autor charakterizuje bakteriální kmeny použité pro výzkum a testované fotosensitizerů. Autorka se podílela na vývoji stabilních sulfonovaných polystyrénových nanočástic se zapouzdřeným hydrofobním fotosensitizerem TPP, polymerních nanočástic PLGA s navázaným kurkumínem (PLGA-CUR) a sledovala synergický efekt komerčně dostupného sensitizeru TMPyP v kombinaci s nanočásticemi stříbra.

Vlastní výsledky jsou shrnuty v samostatné kapitole členěné dle typu studovaných materiálů. Velmi názorně působí výsledky z AFM. Sledování topografie bakterií, srovnání před a po terapii jsou srozumitelné i pro laiky.

Diskuze není příliš rozsáhlá, nicméně důležitá fakta jsou uvedena a diskutována. Téma práce je aktuální, resistantní bakteriální kmeny představují vážný medicínský problém a stojí za značným počtem úmrtí pacientů v nemocnicích. Autorka popsala synergní efekt senzitizeru TMPyP s AgNPs na Gram pozitivní i negativní bakterie. V další části práce sledovala fotodynamický efekt zapouzdřených TPP syntetizérů. Potvrdila, že Gram-negativní bakterie jsou vůči fototerapii odolnější díky odlišné struktuře buněčné stěny. Poslední část je věnována PLGA částicím s navázaným kukurumínem, který se blíží představě ideálního fotosenzitizeru a pokud je vázán na vhodný nosič, jeho vlastnosti se ještě vylepší.

Předkladatelka publikovala 5 vědeckých článků v časopisech s IF, z toho dvakrát jako první autor. Dále je spoluautorkou 1 článku publikovaných v časopisu bez IF a šestkrát uveřejnila abstrakt ve sborníku.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Jakým způsobem byly vybírány bakteriální kmeny ke studiu účinku fotosenzitizerů? Proč jste vybrala konkrétně tyto kmeny?
2. Proč nebyly u všech 3 skupin látek použity stejné testy?
3. Proč nebyly pomocí AFM charakterizovány všechny NP-PS systémy?
4. 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?
5. Jaké vlnové délky (jaká absorpční maxima) jsou obecně lepší a účinnější pro aPDT?
6. 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?
7. 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 funkční při použití této lampy? Který z použitých ozařovačů je vhodnější a proč?
8. Uvádíte, že se aPDI jeví jako vhodná alternativa k antibiotické léčbě, jak by to probíhalo konkrétně u pacienta postiženého infekcí ?
9. Ob. 21 má nízkou kvalitu, je obtížně čitelný.

Během studia Mgr. Zuzana Malá získala a následně i experimentálně využila celou řadu poznatků k velmi aktuálnímu tématu – antimikrobiální fotodynamické inaktivaci. Studovala antimikrobiální fotodynamickou inaktivaci na Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriálních kmenech, porovnávala výhody a nevýhody testovaných fotosenzitizerů, na vývoji části z nich se i podílela.

Autorka ve své disertační práci prokázala schopnost samostatné tvůrčí vědecké činnosti. Její výzkumná práce splňuje požadavky standardně kladené na disertační práci v daném oboru. Na základě těchto skutečností, a i přes výše uvedené výhrady doporučuji předloženou disertační práci k obhajobě a

souhlasím s udělením akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle §47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci 24.5.2021

Mgr.Šárka Hradilová, Ph.D

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

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Zuzany Malé

s názvem

Nanomateriály a studium účinnosti fotodynamické reakce na bakteriálních kmenech

Předložená práce k oponentuře autorky Mgr. Zuzany Malé se věnuje studiu účinků fotosenzitivních látek v kombinaci s nanočásticemi na vybrané bakteriální kmeny v podobě fotodynamické terapie.

Disertační práce má charakter uceleného textu standardního formátu a obsahu. Práce má celkem 99 číslovaných stran textu včetně souhrnu citací a seznamu publikační aktivity autorky. Celá práce je členěna do 15 číslovaných kapitol zahrnujících stručnou úvodní kapitolu, kapitolu věnující se obecně problematice fotodynamické terapie, kapitolu blíže popisující antimikrobiální fotodynamickou inaktivaci, následně kapitolu věnující se mechanismu destrukce tumorů, kapitolu popisující typy buněčné smrti, kapitolu zaměřenou na fotosensitizéry, kapitolu o nanočásticích a jejich biomedicínské aplikaci, kapitolu s textem věnujícím se zdrojům záření pro fotodynamickou terapii, kapitolu věnující se bakteriím, kapitolu zaměřenou na moderní mikroskopické metody, kapitolu popisující cíle práce. Následuje číslovaná kapitola se souhrnným názvem „experimentální část“, dále kapitola „výsledky“, „diskuze“ a „závěr“. Následuje seznam použité literatury a výčet publikační aktivity autorky.

První kapitola je vlastně pouze úvodní větou pro celou disertační práci. Kapitola „fotodynamická terapie“ popisuje funkční princip této léčebné metody a její reakční typy. Další kapitola „antimikrobiální fotodynamická inaktivace“ popisuje fotodynamickou terapii na úrovni bakterií, resp. jejich antibiotikům rezistentních forem. Následuje kapitola „mechanismus destrukce nádoru“, věnující se mechanismům destrukce tumorů za pomoci fotosensitivních látek, včetně popisu poškození cévního systému nádoru a imunitní odpovědi organismu. Kapitola „buněčná smrt“ je věnována popisu nekrózy, apoptózy a autofagie. Další kapitola „fotosensitizéry“ zpracovává téma hlavní komponenty fotodynamické terapie a dále je podrobněji klasifikuje. Následující kapitola „nanočástice a jejich biomedicínské aplikace“ se věnuje nanočásticím stříbra, polystyrenovým nanočásticím a polymerním nanočásticím PLGA. V další kapitole „zdroje záření pro fotodynamickou terapii“ se autorka věnuje detailněji zdrojům elektromagnetického záření využívaným pro fotodynamickou terapii. Kapitola „bakterie“ seznamuje čtenáře se základy biologie bakteriální buňky a typy bakteriálních kmenů. V další kapitole nazvané „moderní mikroskopické techniky“ je popsána problematika mikroskopie atomárních sil, včetně možných variant módů této metody. Kapitola s názvem „cíle práce“ v šesti bodech seznamuje čtenáře s vytyčenými cíli. Dvanáctou kapitolou je kapitola „experimentální část“, sestávající se z podkapitoly Materiál a metody. Navazuje kapitola „výsledky“, popisující synergický efekt fotosensitizeru a nanočástic stříbra, fotosensitizeru a polystyrenových nanočástic, mikroskopická studie nanočástice s enkapsulovaným fotosensitizerem, mikroskopické studie použitých bakteriálních kmenů po fotodynamické terapii, charakteristika použitých PLGA poly(laktid-ko-glykolid) mikročástic a studie fototoxicity kurkumínu. Následuje osmistránková diskuse, věnující se efektu studovaných fotosensitizerů v kombinaci s nanomateriály, vše v kontextu k vybraným bakteriálním kmenům. Následující kapitola „závěr“ je spíše menšího rozsahu a informuje čtenáře v obecné rovině o realizovaném výzkumu.

Seznam citací a použitých literárních zdrojů uvedený na konci disertační práce obsahuje přes 150 odkazů na relevantní výzkumné či souhrnné práce. Majoritní zastoupení tvoří práce v anglickém jazyce, minoritní skupinu práce publikované v jazyce českém. V citačních zdrojích jsou zastoupeny hojně periodika s „impakt faktorem“ a se zejména novějším datem publikování.

Předložená práce je tak dobře zasazena do kontextu aktuálních otázek vědy a reaguje na aktuální výsledky výzkumu. V tomto ohledu nelze vznést jakýchkoliv námitek.

Po stránce stylistické a kvality textu je práce na dobré úrovni, malou osobní výtku si však dovolím poznamenat k struktuře členění kapitol. Například kapitola 1. Úvod, sestávající se z textu necelých tří řádků, či kapitola 12. Experimentální část, sestávající se z jediné podkapitoly Materiál a metody (kdy bylo možné pro snazší orientaci tuto podkapitolu rovnou značit jako kapitolu 12.) Toto jsou ale nepodstatné poznámky, které v žádném případě nesnižují celkovou úroveň práce. Další poznámku si dovolím pronést k včlenění textu kapitoly 4. Mechanismus destrukce nádoru do celkového obsahu práce. Tato práce nezpracovává výsledky experimentů fotosensitivních látek na nádorových buněčných liniích, proto považuji tento text za nadbytečný. Drobný komentář také věnuji závěrečné kapitole, kde bych očekával detailnější zhodnocení provedených experimentů a získaných výsledků ve vztahu k jednotlivým definovaným a v práci uvedeným experimentálními cíli. V dané formě se jeví závěr hodně všeobecný. Poznámku také věnuji grafům, v kterých je v hojné míře doprovodný popis v anglickém jazyce, přesto, že celá práce je v jazyce českém.

Předloženou práci i přes drobné komentáře hodnotím jako zdařilou a ve svém obsahu přínosnou. Autorka v praktické části prezentuje velké množství dat, podložené zvládnutím a osvojením si širokého spektra laboratorních metod a technik, které byly v dané studii fotosensitizérů použity.

Realizovaná studie má reálné opodstatnění, zejména s přihlédnutím k zvyšující se incidenci výskytu rezistentních bakterií a nespornému benefitu zvolené fotodynamické terapie v podobě cílené léčby. Proto je zvolené téma z medicínského hlediska velmi aktuální. Vlastní práce obsahuje množství cenných experimentálních dat, které je možno použít pro další vývoj a zdokonalení metody fotodynamické terapie, a to nejen na poli léčby bakteriální infekce, ale i v širších aplikacích této inovativní léčebné metody.

Hodnocená disertační práce vykazuje všechny znaky pro splnění podmínek samostatné tvůrčí vědecké práce a obsahuje původní vědecké výsledky. Tyto byly autorkou publikovány v pěti

původních vědeckých publikacích časopisů s IF, přičemž z toho dvě prvoautorsky. Soupis autorčiných publikačních činností také zahrnuje prvouautorský článek v recenzovaném odborném periodiku a šest konferenčních abstraktů. Prezentovaná četná publikační aktivita autorky ukazuje na její vysoký zájem a orientaci v oblasti vědy.

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

Předloženou disertační práci Mgr. Zuzany Malé „Nanomateriály a studium účinnosti fotodynamické reakce na bakteriálních kmenech“ doporučuji k obhajobě pro udělení akademického titulu Ph.D. (podle §47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.)

Otázky k obhajobě: Prosím o komentář a vyjádření se ke všem jednotlivým cílům práce definovaným v kapitole 11. v souhrnné stručné formě, nebude-li toto součástí autorčiny prezentace k obhajobě.

V Brně dne 12.5.2021

doc. Mgr. Vladan Bernard, Ph.D.