



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, tř. Svobody 8, 771 26 Olomouc

V Olomouci 29. srpna 2016

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská biofyzika

Mgr. Hana Zapletalová, studentka prezenční formy doktorského studijního programu *Lékařská biofyzika* na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „**Studium DNA a magnetických nosičů metodou mikroskopie atomárních sil**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 29. srpna 2016 v 11:00 hod.

Komise:

předseda: prof. Ing. Jan Hálek, CSc. ✓

místopředseda: doc. RNDr. Jiřina Škorpíková, CSc. ✓

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

Mgr. Jaromír Vachutka, Ph.D. ✓

Mgr. Vladan Bernard, Ph.D. ✓

Oponenti:

doc. RNDr. Roman Kubínek, CSc. ✓

Katedra experimentální fyziky, Přírodovědecká fa UP Olomouc

Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D. ✓

Vysoké účetní technické v Brně, Ústav mikroelektroniky

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. Uchazeč odpověděl na připomínky a dotazy oponentů.

Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

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

Usnesení:

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

.....
prof. Ing. Jan Hálek, CSc.
předseda komise

Zapletalová Hana Ztracená 258/14 Olomouc	Referát pro vědu a výzkum LF UP Olomouc
---	--

Zápis z diskuze obhajoby dizertační práce

Název práce: Studium DNA a magnetických nosičů metodou mikroskopie atomárních sil

Autor práce: Mgr. Hana Zapletalová

Školitel: Prof. RNDr. Hana Kolářová, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP

Oponenti práce: Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D., doc.RNDr. Roman Kubínek, CSc.

Datum obhajoby: 29. 8. 2016

1) Otázky oponentů

1.1. doc. Kubínek, CSc.

Str 7 – v odstavci věnovaném EM nesouhlasí s tím, že zvětšení EM je až 30 000 násobné. Mělo by být vyšší – např. u TEM a HRTEM.

Citovaná literatura odpovídá rozšířenému povědomí ohledně EM. Ve vědecké praxi je však v kvalitně vybavených laboratořích běžné, že při použití urychlovacího napětí 15 kV je (u TEM) běžně dosahováno zvětšení až 300 000× (odpovídá rozlišení přibližně 1,2 nm). Nejmodernější přístroje dnešní doby jsou schopny dosáhnout rozlišení i pod 0,5 nm (malé vzorky, ultratenké vrstvy, TEM), konkrétně TEM s urychlovacím napětím 200kV se pohybuje okolo 0,2 nm v závislosti na pracovním módu a použitém detektoru.

U HRTEM (metoda detekce obrazu na základě interference přímého a difraktovaného elektronového paprsku) je dosaženo krajního rozlišení až 0,08nm (pro krystaly). U HRTEM je však dosaženo vysokého rozlišení na úkor malého kontrastu.

V souvislosti s obr . 2 – dotaz – jak se útvary magnetických nosičů o velikosti desítek mikrometrů chovají v lidském těle oproti magnetickým nosičům o velikosti desítek nanometrů.

Magnetické mikročástice (průměr 500nm a větší) – aplikace převážně v oblasti analytické separace:

- a) separace buněk (ale i např. spermií) – tzv. magneto-imunologická separace
- b) bílkovin a jiných biomolekul ze složitých směsí pomocí magnetického pole.

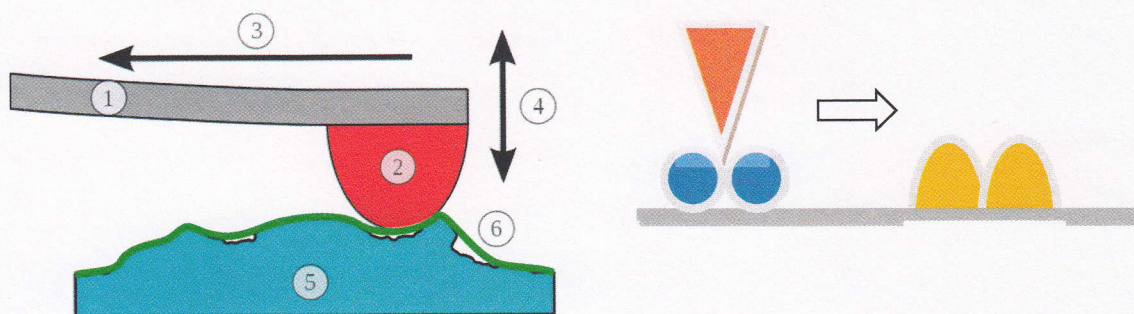
Prostřednictvím protilátek navázaných na povrchu nosiče lze vychytávat ze vzorků a posléze analyzovat např. cirkulující rakovinné buňky z krve onkologických pacientů.

S klesajícím rozměrem magnetického nosiče roste poměr plocha (S) částice ku objemu částice (V) => vysoká efektivní plocha povrchu = více navázaných požadovaných ligandů pro cílený transfer. Zároveň se se zmenšujícím poloměrem částice zvyšuje šance pro distribuci prostřednictvím tkáňové difúze a snižuje se pravděpodobnost rozpoznání magnetického nosiče buňkami imunitního systému. S klesajícím rozměrem magnetického nosiče ubývá také magnetických domén. Od určitého kritického rozměru magnetická nano-částice vykazuje jedno-doménový charakter = magnetické momenty všech atomů míří v jednom směru = kooperují spolu skrz celou částici (tj. magnetický moment atomu ležícího na jednom konci částice ví o vše o chování magnetického momentu atomu ležícího na druhém konci částice) = částice pak navenek vykazuje ohromný magnetický moment (velikost v tisících až deseti tisících Bohrových magnetonů) = využití v NMR jako vynikající kontrastní látka, také při hypertermii - cílené destrukci tkáně vlivem indukovaného tepla, atp.

Str 17 – uvedeno že bylo dosaženo subatomárního rozlišení při zobrazení biomolekuly DNA – rozlišení žlábků. Opravdu šlo o rozlišení pod 10^{-10}m ?

Rozlišení žlábků, jež jsou rozmístěny na vlákně DNA v rozpětí 3nm a 5nm samozřejmě neimplikuje přímo subatomární rozlišení ☺, důležité je zmínit, zda jde v praxi o rozlišení v ose Z či v rovině XY (kde bývá zpravidla rozlišení o řád horší) a jakým způsobem bylo dosaženo. V textu citovaných článků je specifikováno, že jde o detekci v ose Z, kdy zmíněné žlábků byly detekovány na základě změn ve výšce zobrazeného profilu vlákna DNA o 0,2nm. (Leung et al 2012). Analogicky také v Cerreta et al 2013 – V obou případech bylo použito speciální frekvenčně modulované AFM.

Obr. 6 – na pravé straně není uvedeno, co je na obrázku – ani v textu na to není odkaz



Obr. 6: Schéma vzniku topografického obrazu při AFM skenování, (1) nosník, (2) hrot, (3) směr skenování, (4) vertikální posun hrotu, (5) reálný povrch vzorku, (6) zobrazený povrch vzorku.

Citovaný Obr 6 ilustruje právě zmíněnou konvoluci velikosti koncového poloměru hrotu a velikosti zobrazovaného objektu, jež se odráží v naměřeném výškovém profilu zobrazovaného předmětu a je samo o sobě zdrojem četných artefaktů v obrazu (viz pravá část obr 6). Např. kulové objekty nemohou být nikdy zobrazeny jako kulové, ale vždy pouze jako hrompěle.

Str 45 – jedná se o diamagnetickou složku na povrchu magnetické částice nebo o dielektrickou, tedy elektricky nevodivou?

Studované syntetizované částice mají obal jádra tvořený diamagnetickou složkou, jak je obecně uvedeno na str. 45 – poslední odstavec věnovaný magnetickým mikročásticím aplikovaným v separačních metodách.

Je správně zkratka root mean square – Rms – jak je v textu uváděno?

Ano, zkratka RMS, symbolicky značená v podobě RMS,. Rms či Rq značí root mean square roughnes, statistický parametr vystihující výškovou distribuci v analyzované ploše.

RMS (Root mean Square, značeno také Rms, Rq): reprezentuje střední kvadratickou odchylku o dané proměnné:

$$Rms = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N r_j^2}$$

Ra (average roughness) je definovaná jako průměrná odchylka všech výškových hodnot v dané oblasti vzhledem ke střední hodnotě:

$$Ra = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |r_j|$$

V obr. 37 částice na snímku z AFM nevykazují žádné zaoblení?

Zmíněný AFM snímek zobrazuje komerční nosiče, které nevykazovaly kulově symetrický tvar. Jde o snímek získaný v kanálu Peak-Force_error, tedy nejde o obraz topografický, na kterém by byly zřejmé výškové změny v morfologii částice.

Přesto lze v dolní horizontální linii usuzovat na zaoblení částice – jak je zřejmé při pohybu hrotu po přední hraně částice – kdy se hrot doslova „šplhá“ po zaoblené hraně nahoru. Tyto zobrazované částice jsou jedny z největších, které byly analyzovány. Právě díky jejich velkému rozměru není dílčí zaoblení částic již tak zřejmé, jako např. u částic o průměru okolo 1μm a méně.

Jakým způsobem se prováděly BET analýzy magnetických nanočástic?

K měření plochy povrchu a porozity materiálů byl použit BET analyzátor - Sorptomatic 1990, založený na tzv. statické volumetrické metodě (proměření adsorpční izotermy v diskretních krocích). V základním vybavení se používá pro fyzisorpční měření (fyzikální adsorpce) pro určování specifické plochy povrchu a distribuci šířek mikro a mezopórů porézních materiálů použitím plynů jako dusík, argon, krypton,...

Byly BET analýzy prováděny u všech předložených vzorků?

BET analýza byla provedena pouze u vybraných vzorků magnetických nosičů – B 30 ox, B 77 a HPS – B -21. K BET analýze je potřeba značného množství částic (100g a více syntetizovaných nosičů) a pro vlastní srovnání souvislosti mezi porézností studovaných částic a AFM naměřenými Rms hodnotami bylo toto srovnání dostatečné.

1.2. Mgr. Fohlerová, PhD.

Lze kvantitativně zhodnotit množství DNA adsorbované na zkoumané povrchy?

Vzhledem k vlastní metodice nanášení DNA na modifikovaný povrch (opakovaný oplach vzorku a osušení stlačeným plynem vedoucí k odstranění neuchycených molekul DNA) nelze kvantitativně zhodnotit konečné množství DNA adsorbované na zkoumaném povrchu.

Předchozí dotaz byl myšlen v tom smyslu, zda jste zkoušeli dávat určitou koncentraci DNA a tu, která se adsorbuje následně deadsorbovat a kvantifikovat její množství?

Ne, u vzorků jsme kvantifikaci touto cestou neprováděli. S podobným postupem jsem se v literatuře dosud nesetkala, nedomnívám se, že je kvantifikace tímto způsobem fakticky možná.

V práci na str. 58 zmiňujete, že lze sledovat detailní strukturu vlákna DNA (stupeň kondenzace, nadšroubovicové vinutí). Můžete tyto jevy (v závislosti na typu povrchu) více objasnit a ukázat na konkrétních vzorcích?

Cílem práce bylo zavedení metodik vedoucích k efektivnímu zobrazení molekul DNA metodou AFM a jejich ověření při fotodynamickém působení vybraných senzitizerů. Studované vzorky nebyly zkoumány s cílem vyhodnotit působení interkalátorů. Na našich vzorcích nebyla zaznamenána změna stupně kondenzace zobrazených DNA vláken či změna vinutí. I když některé publikace uvádí, že TMPyP se váže po ozáření přímo na vlákno DNA – na našich snímcích nebyla zřejmá změna v konformaci zobrazené DNA u vzorků ovlivněných a vzorků kontrolních.

2) Otázky, odpovědi a komentáře v rámci diskuze

Prof. Ing. Jan Hálek, CSc.: Doporučuji využít práci pro výuku studentů zubního i všeobecného lékařství.

doc. RNDr. Jiřina Škorpíková, CSc.: Mluvila jste o zkoumání struktury DNA, jaké je tedy omezení pro použití elektronového mikroskopu ve srovnání s AFM pro tyto analýzy?

Rozdíl při použití EM a AFM je zejména v rychlosti přípravy vzorku, náročnosti přípravy a tedy také v ceně připravených a analyzovaných vzorků. Jako klíčové vidím možnost studovat DNA přímo v podmínkách blízkým fyziologickým podmínkám a možnost studovat dynamické změny na vlákně DNA po přidání např. interkalátorů, enzymů či proteinů.

MUDr. Mgr. Robert Bajgar, Ph.D.: Zhodnocení povrchu nosičů bylo pouze na základě subjektivního hodnocení nebo byla provedena i kvantifikace?

Zhodnocení tvaru nosičů bylo provedeno vizuálně ze získaných AFM snímků. Co se týče parametrů povrchu (hodnoty Rms), tak tyto jsou vyhodnoceny standardní statistickou cestou na základě dat získaných z analýzy obrazu.

Následně byly porovnány hodnoty Rms, vizuální výsledky a hodnoty získané z BET analýzy u vybraných vzorků. Bylo ověřeno, že data z BET izoterm korelují s výsledky získanými AFM analýzou.

Mgr. Vladan Bernard, Ph.D. : Je rozdíl v síle vazby DNA na slídu u fragmentované a nefragmentované DNA?

Síla vazby závisí na počtu elektrostatických interakcí mezi vláknem DNA a modifikovaným substrátem. Tedy delší vlákno by mělo být lépe přichycené k substrátu oproti krátkému vláknu. Nicméně povrchový náboj vlákna DNA je dostatečný pro uchycení i velmi krátkého fragmentu.

Pokud myslíte dotaz ve smyslu, že u delších fragmentů DNA bylo snazší imobilizovat DNA oproti krátkým fragmentům – tak tento rozdíl se občas projevoval při zavádění metody. Po optimalizaci metody jsem žádné rozdíly nepozorovala.

Mgr. Jaromír Vachutka, Ph.D.: S použitím mikroskopu, který jste použila ve Vaší práci, jak velký detail jsme schopni rozlišit?

S využitím našeho mikroskopu BIOSCOPE CATALYST jsme schopni rozlišit dostatečně jednotlivá vlákna DNA (jak ssDNA tak dsDNA), avšak jednotlivé žlábků DNA již schopni rozlišit nejsme, k tomuto jsou potřeba speciálně modulované AFM přístroje při použití speciálních (velmi drahých) hrotů. Bioscope Catalyst je obecně specializován na zobrazování buněk.

Prof. Hálek: Lze rozpoznat jedno- a dvouřetězcovou DNA tzv. na první pohled? A dále používají se ke stabilizaci nějaké stabilizační proteiny – jsou nějaké známy z literatury?

Ano, rozpoznat jedno a dvou vláknovou DNA na AFM snímcích lze poměrně snadno. Vlákno ssDNA má zřetelně menší průměr než vlákno dsDNA. Navíc u krátkých fragmentů se ssDNA zpravidla svine do klubka (do cca 200bp) či vykazuje odlišnou konformaci.