



Posudek disertační práce Mgr. Jiřího Mrázka

V předložené práci s názvem „Kontrastní látky na bázi upkonverzních nanočástic pro použití v biomedicíně“ je řešena problematika reprodukovatelné přípravy upkonverzních částic, možnosti navázání derivátů kyseliny hyaluronové a jejich využití jako kontrastní látka pro zobrazení biologických struktur. Jedná se o velmi aktuální téma a využití tohoto typu částic má velký potenciál v mikroskopických technikách ke konvenčním fluoroforům. Díky použití IR excitačního záření je minimalizována negativní autofluorescence, která může potlačit signál protilátek s navázaným fluoroforem a také je snížena fototoxická např. pro aplikace s časově náročným snímáním živých buněk.

Práce je logicky rozdělena do 4 multidisciplinárních kapitol:

V první kapitole je popsána reprodukovatelná syntéza upkonverzních nanočástic bez nečistot s emisním spektrem pokrývajícím UV, viditelnou a blízkou IR oblast. Dále je v kapitole popsána příprava částic v konfiguraci jádro/slupka s řádově silnější luminescencí. Připravené částice jsou charakterizovány pomocí SEM/TEM mikroskopie, FTIR analýzy a rentgenové difrakční spektrometrie.

Druhá kapitola popisuje problematiku navázání dvou typů derivátů kyseliny hyaluronové na připravených částicích. První jsou mycelám podobné agregáty částic s oleyl-HA připravených mikroemulzní metodou u kterých je dále řešena jejich stability v kultivačních médiích. Tyto částice byla ještě doplněny o peptidovou sekvenci s afinitou k buňkám karcinomu prsu. Druhým typem jsou částice, na které byl adsorbován HA-furanyl. Částice s navázanou HA byly charakterizovány termogravimetricky, optickou emisní spektrometrií a byl měřena zeta potenciál.

Třetí kapitola se věnuje problematice mikroskopického snímání připravených částic při in vitro experimentech. Je popsána úprava widefield epiluminiscenčního mikroskopu pro připojení excitačního laserové zdroje a úprava optické soustavy pro použití s IR zdrojem a vytvoření homogenního osvětlení pro excitaci částic ve vzorku při zachování možnosti použití i klasických fluorescenčních barviv. Testování připraveného systému bylo realizováno pomocí navrženého fantomu.

Ve čtvrté kapitole jsou připravené částice s navázanými deriváty kyseliny hyaluronové využity při in vitro experimentech s primokulturou lidských dermálních fibroblastů, nádorovou linií buněk MDA-MB-231 a prasečí tkání. Experimentálně je hodnocena cytotoxicita připravených částic použitím metabolických testů a live-dead značení a dále jsou částice použity jako kontrastní látka. U prasečí kůže byla hodnocena schopnost penetrace na histologických řezech.

Metody a výsledky prezentované v práci jsou součástí autorových 3 publikací (u 2 publikací první autor, u 1 publikace v pozici druhého autora). Zpracování textu přehledné, vhodně je i zvoleno o toto rozdělení na 4 tematické kapitoly kde každá kapitola má svou diskusi a shrnutí stěžejních výsledků. Věty jsou formulovány srozumitelně na dobré jazykové úrovni. Po formální stránce je předložená disertační práce v pořádku. Práce cituje 141 původních prací

(2010+). Velmi pozitivně hodnotím i další autorův publikační potenciál. Autor uvádí dalších 8 publikací bez přímého vztahu k disertaci kde je až na dvě výjimky na předních místech a značně tak převyšuje běžné nároky kladené na publikační činnost studenta doktorského studia. Na základě vysoké úrovně disertační práce i publikační činnosti konstatuji, že doktorand prokázal hluboké znalosti v daném oboru a je schopen týmové vědecko-výzkumné práce.

Otázky k diskusi:

1. Pro využití v in vitro podmínkách popisujete krátce sterilizaci částic, kde filtrace je nevhodná a dále zmiňujete „wet heat“. Mohl byste blíže specifikovat tento postup – jedná se o parní sterilizaci?
2. V práci popisujete dostupnou úpravu widefield epifluorescenčního mikroskopu pro použití při zobrazení struktur s UCNP, kde využíváte laserové diody o vlnových délkách 975 a 985 nm. Bylo by možné i použití dostupných výkonných IR LED diody v obdobné vlnové délce, byť se širším pásmem?
3. V rámci in vitro experimentů demonstujete mikroskopické zobrazení pomocí UCNP ovšem po fixaci kultury a jejím dalším barvení buněk (f-actin, jádra). Výhodou těchto částic je i možnost zobrazení s živou kulturou nebo využití pro sledování průběžné dynamiky vývoje kultury. Realizovali jste i zobrazení živé kultury s těmito částicemi, bez fixace? Uvažovali jste i o sledování dynamiky, jak se chytají částice na buňky – např. časosběrné snímání?

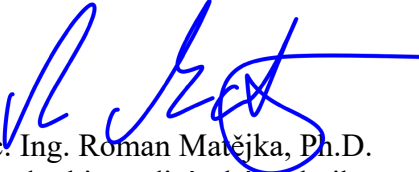
Disertační práce Mgr. Jiřího Mrázka splňuje veškeré požadavky, které jsou na takovou práci kladeny. Autor prokázal tvůrčí schopnost a předpoklady pro samostatnou vědeckou práci.

Předloženou práci proto

DOPORUČUJI

k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby poté doporučuji udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

V Kladně dne 1. 2. 2023



doc. Ing. Roman Matějka, Ph.D.
Katedra biomedicínské techniky
FBMI ČVUT v Praze