

Posudek disertační práce Ing. Michaely Rabochové

Název práce: Studium interakcí kovových nanočástic a mikrobiologických objektů prostřednictvím pokročilých mikroskopických metod

Disertační práce byla vypracována na katedře přírodovědných oborů Fakulty biomedicínského inženýrství ČVUT v Praze a v rámci této práce se Ing. Rabochová zabývala několika vybranými metodami, které lze použít pro pozorování biologických objektů, zde v práci zejména vybraných druhů plísní a kvasinek a dále pak pro charakterizaci stříbrných nanočástic syntetizovaných pomocí biologického přístupu s použitím extraktu získaného z vinné révy. Práce je tedy interdisciplinární a propojuje jednak mikrobiologickou část, která popisuje zejména vzhled studovaných mikroorganismů za různých podmínek (ovlivnění působením stříbrných nanočástic či nízkoteplotního plazmatu) a jednak část metodickou, zaměřenou na moderní mikroskopické techniky, kterými lze tyto mikroorganismy pozorovat (konkrétně pak skenovací elektronovou mikroskopii a mikroskopii atomárních sil).

Disertační práce je členěna do několika částí. V první, úvodní části, je na zhruba deseti stranách presentován současný stav problematiky mikromycetních infekcí, tedy infekcí, které představují významný klinický problém současnosti. Jsou zde zmíněny i přístupy vedoucí k potlačení těchto infekcí, za použití stříbrných nanočástic či nízkoteplotního plazmatu. Poté jsou v další kapitole popsány techniky elektronové mikroskopie, které se využívají pro studium biologických objektů. Je zde však zmíněna pouze skenovací elektronová mikroskopie. Následují tři části práce, korespondující s cíli disertační práce, každá část je samonosná a obsahuje jak úvodní stav řešené problematiky, tak i metodickou část, část výsledků a většinou poměrně krátkou diskusi. Poté jsou presentovány části práce týkající se přínosu práce pro obor biomedicínského inženýrství, závěr a seznamy publikací, tabulek, obrázků a grafů.

V předložené disertační práci Ing. Rabochové jsem posuzoval zejména:

Aktuálnost tématu disertační práce:

Téma disertační práce rozhodně patří mezi aktuální témata současné vědy. V poslední době je čím dál větším celosvětovým problémem narůstající resistence mikroorganismů vůči působení antimikrobiálních látek a proto hledání nových látek či detailnější popis působení těch současných a pochopení mechanismů jejich účinků je velmi zásadní. Stejně tak nalezení či vylepšení vhodných metodických přístupů a technik potřebných k tomuto studiu.

Splnění cílů disertační práce:

Předložená disertační práce si stanovila tři hlavní cíle: 1. zabývat se aplikací pokročilých mikroskopických metod na charakterizaci nanočástic a identifikaci morfologických změn buněčného povrchu *Candida albicans* vlivem působení stříbrných nanočástic; 2. aplikovat pokročilé mikroskopické metody na identifikaci morfologických změn buněčných povrchů

vybraných mikromycetních spor a jejich biofilmů vlivem působení nízkoteplotního plazmatu a 3. aplikovat pokročilé mikroskopické metody na identifikaci změn vnitřních struktur vybraných mikromycetních spor a *Candida albicans* vlivem působení antifungálních prostředků.

Všechny tyto tři cíle byly splněny, jak dokládá i členění této disertační práce do tří podkapitol v souladu s těmito cíli práce.

Metody a postupy řešení:

Metodická část, náležící vždy k dané studované problematice je většinou poměrně stručná, nicméně na několika místech je zmiňován odkaz na publikace, u nichž je paní inženýrka spoluautorkou a lze tedy dohledat detailní informace o použitých metodách v těchto publikacích.

Výsledky disertační práce a konkrétní přínosy disertanta:

Výsledky disertační práce jsou přehledně zpracovány a prezentovány jednak přímo v disertační práci a jednak v recenzovaných publikacích autorky. Ne vždy je zcela zřejmé, co vše bylo prováděno přímo paní inženýrkou a co jejími spolupracovníky, ať už v Centru výzkumu v Řeži či na VŠCHT. Nicméně předpokládám, že všechny mikroskopické techniky včetně FIB-SEM a AFM prováděla paní inženýrka osobně.

Kvalita výsledků je pak doložena čtyřmi recenzovanými publikacemi v kvalitních mezinárodních časopisech, kde je paní inženýrka Rabochová autorkou či spoluautorkou. Celkovým přínosem disertanta je pak prezentace a zhodnocení výsledků několika vybraných metod a postupů, které lze použít pro studium antimikrobiálních přístupů.

Význam pro praxi a rozvoj studijního oboru Biomedicínská a klinická technika:

Popis využití a možností použití různých technik, které lze použít pro studium účinku antimikrobiálních látek na vybrané mikroorganismy je velmi důležitý pro posouzení a studium vlivu těchto látek a nalezení nových antimikrobiálních látek s lepším účinkem či takových, které nebudou způsobovat rezistence mikroorganismů. Toto patří pod priority současného mikrobiologického výzkumu. Z hlediska rozvoje studijního oboru oceňuji interdisciplinární charakter práce, propojení mikrobiologických metod a velmi moderních mikroskopických technik. Zejména pak techniky FIB-SEM, která má velkou budoucnost. Taktéž velmi kladně hodnotím navázání prospěšné spolupráce disertantky s externím pracovištěm na VŠCHT.

Formální úprava disertační práce a její jazyková úroveň:

Práce je psána poměrně čtivě, tím, že obsahuje řadu velmi pěkných snímků z elektronové mikroskopie či mikroskopie atomárních sil, tak je zajímavá a atraktivní i po grafické stránce. Mám pouze několik výhrad k její jazykové úrovni. V práci je řada překlepů (např. i psaní názvu plísní *Aspergillus* vs *Aspergillus*) a poměrně často se vyskytují věty, kde není ve shodě podmět s přísudkem. Toto lze prezentovat například hned na druhé a třetí větě nejdůležitější části, Abstraktu práce, které obsahují překlepy a jazykově ne zcela vhodné formulace. Cituji: „*Mikromycetní infekce způsobující závažná invazivní a diseminovaná onemocnění spojené s vysokou mírou přidružené mortality jsou vážnou hrozbou pro současnou medicínu zejména imunodeficientních pacientů*“. Mělo by nejspíše být: „*infekce a onemocnění spojená s...*“ a co

znamená pojem „medicína imunodeficientních pacientů“? Hned další věta: „*Prioritou mnohých vědecko-výzkumných pracovišť po celém je nalezení inovativních metod vývoje antifungálních léčiv*“, v níž evidentně vypadlo celé slovo, nejspíše „světě“. Taktéž jsou občas nevhodně použita slovní spojení či pojmy, například: „*uhníždění mikroorganismů*“, či „*onemocnění patogenními mikromycetními biofilmy*“. Z věty „*Na pracovišti Ústavu biotechnologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze vedené paní doc. Ing. Olgou Mařátkovou, Ph.D. a paní Ing. Annou Miškovskou...*“ to vypadá, že uvedené kolegyně vedou VŠCHT.

Připomínky a závěrečné zhodnocení disertační práce:

Pro analýzu nanočástic stříbra, připravených biosynteticky, bych pro příště zvážil i použití transmisní elektronové mikroskopie, ideálně vysokorozlišovací TEM. Získalo by se jistě více informací o struktuře a vzhledu těchto nanočástic, možná by bylo možné i rozlišit i povrch nanočástic Ag s extraktem a v destilované vodě (možná by byla viditelná vnější vrstva okolo nanočástic připravených v extraktu *Vitis vinifera*).

Nezvažovali jste použití AFM i v kapalině, tedy použití kapalinové cely? V ní lze poměrně dobře pozorovat řady biologických objektů, aniž by se musely vysoušet a nedocházelo by tak k poškození struktury biologických objektů.

Nezvažovali jste před mikroskopií použít nějaké techniky fixací pozorovaných mikromycet, aby nedocházelo ke kolapsu biologických struktur díky vysoušení a aplikaci vakua? Přijde mi, že řada aspektů, zmiňovaných v jednotlivých kapitolách mohla souviset právě s kolapsem struktury díky odvodnění biologického objektu. Například při mikroskopii *Candida albicans* pomocí FIB-SEM nebylo snadné za daných podmínek pozorovat vnitřní struktury kvasinky a bylo nutné aplikovat metodu IBID – ochranných obálek. Zde by možná vhodná fixace mohla pomoci.

Ohledně využití stříbrných nanočástic v medicíně, zejména jako orálně podávaných léků, jsem poměrně skeptický. Za již více než 20 let studia využití stříbrných nanočástic se obávám, že kromě jejich použití v topických přípravcích, obvazech, náplastích, či textiliích si těžko najdou místo i mezi orálně podávanými přípravky – vhodnými pro Vámi popisované mikromycetní infekce.

Lze posoudit možnosti širšího použití nízkoteplotního plazmatu i v klinické praxi? Jaká bude cena ošetření materiálů a přístrojová náročnost, ve srovnání s metodami používanými v současnosti, např. ozařování pomocí UV světla či autoklávování?

Výsledky prezentované na Grafech 1 a 2 – velikosti syntetizovaných nanočástic Ag. U částic, které byly Vámi posouzeny jako monodisperzní, jsou jejich velikosti v rozmezí od 2 do 20 nm. Jak jste definovala, kdy jsou nanočástice ještě monodisperzní a kdy již polydisperzní?

Vliv stříbrných nanočástic na *Candida albicans*: Pouze na základě velikosti a tvaru pozorovaných buněk jste usoudila, že nanočástice Ag působí fungistaticky. Toto odvážné tvrzení lze však velmi snadno pomocí mikrobiologických technik potvrdit. Navrhněte, jakými technikami byste byla schopna posoudit, zda je vliv nanočástic fungicidní či fungistatický.

V disertační práci bych očekával o něco větší prostor věnovaný diskusi. Disertantka by mohla v diskusi porovnat jí použité metody s různými dalšími metodami, které se pro podobné účely používají, vzájemně posoudit jejich výhody a nevýhody. Například porovnat použité metody s metodami cryo-EM, či technikami ultratenkých řezů a následnou TEM.

Další drobné poznámky:

U Obr. 1 bych uvedl o jaká mikromyceta konkrétně jde, tedy která na obrázku vidíme.

Obr. 28 a 29: Dle mého názoru je již z obrázku 29 zřejmé, že vybraná nanočástice je na povrchu buňky, navíc jste analyzovali pouze tuto jednu vybranou nanočástici a na základě toho tvrdíte, že úplně všechny nanočástice jsou přítomné na povrchu buněk?

Závěr:

Předloženou disertační práci hodnotím jako kvalitní, autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce, orientace ve studované problematice, získání kvalitních výsledků a schopnost tyto získané výsledky sepsat a zhodnotit, a to i ve formě 4 kvalitních mezinárodních recenzovaných publikací.

Disertační práci tedy doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 6. 6. 2024

doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.