



**Fakulta vojenského zdravotnictví
Univerzita obrany
Katedra molekulární patologie a biologie**

**Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
Tel.: 973 255 201, Fax: 495 513 018**

Posudek disertační práce

Kandidát: **ing. Jiří Trousil**

Název disertační práce: **Beating Intracellular Bacterial Infections with Polymeric Nanobead-Based Interventions: Development, Structure Characterization, and Analysis**

Supervisor: **Mgr. Martin Hrubý, Ph.D., DSc.**

Externí oponent: **plk. gšt. doc. RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.**

A. Výběr tématu práce

Autor vypracoval práci, ve které zahrnul poznatky z využití nanočástic jako nosiče antibiotik, které jsou endocytovány buňkami imunitního systému a umožňují zabíjení intracelulárních bakterií uvnitř infikovaných buněk. Tato oblast biomedicíny, cílené směřování účinných látek na buňky, je v současné době intenzivně rozvíjena a proto práce ing. Trousila je vysoce aktuální.

B. Struktura disertační práce

Na začátku práce je uveden důvod zadání práce, specifické cíle a zkratky. Dále je pak práce rozčleněna do čtyř nezávislých kapitol. **Kapitola 1** je teoretická část, kde jsou popsány atributy intracelulárních infekcí, konkrétně pak infekce *Mycobacterium tuberculosis*. Podrobně jsou popsány přípravy polymerických nanočástic, měření jejich fyzikálně chemických vlastností a jejich použití v nanomedicíně. V **Kapitole 2** je popsána syntéza a charakterizace blokového kopolymeru, kterého pak autor použil jako nosiče pro antibiotikum Rifampicin (RIF). Dále je v této kapitole uvedena metodika a výsledky stanovení cytotoxicity a internalizace buňkami (převážně monocytomakrofágových a epiteliální linie) jak nanočástic (NP) samotných, tak NP vázaných s RIF. NP-RIF byl pak testován ve dvou *in vivo* modelech, na Zebrafish a myším modelu. V **Kapitole 3** je pak popsána příprava a výsledky fyzikálně-chemického měření dvou graftových polymerů PVA a CS. **Kapitola 4** obsahuje shrnutí a budoucí směřování výzkumu. Seznam literatury je uveden u každé kapitoly zvlášť. Na závěr je uveden seznam připojených článků autora disertační práce.

C. Formát práce

Disertační práce je psána ve velmi dobré angličtině. Uspořádání práce je poněkud neobvyklé i u typu komentovaných disertačních prací, kde jsou obvykle příslušné články fyzicky vloženy. Z příložených článků jsme si jako oponent byla schopna stáhnout pouze JEDEN a to P4. Dále pak je chyba v číslování, protože kapitola „1.1 Intracellular Infection“ nezačíná číslem 1, jak je uvedeno „Obsahu“, ale strana je očíslována 13.

D. Výsledky a splnění specifických cílů

V disertační práci jsou výsledky získané zkoumáním dvou typů polymerů. V případě blokových kopolymerů získali výsledky jak z charakterizace NPs, tak z jejich biologických účinků v *in vitro* i *in vivo* modelů. V případě graftových kopolymerů jsou uvedeny výsledky charakterizace těchto NPs. Nicméně, z biologického hlediska, výsledky testů polymerů na bázi MPEO-*b*-PCL jsou velice cenné. V *in vitro* modelu bylo testováno 4 monocyto-makrofágové linie a jedna epiteliální. U všech docházeli k inkorporaci NPs. NPs-RIF signifikantně snižovalo proliferaci *M. bovis* BCG v Raw 264.7 makrofázích ve srovnání s volným RIF. V *in vivo* modelu na Zebrafish použití NPs-RIF signifikantně prodlužovalo přežití a u myši snižovalo významně počet CFU v plicích i slezinách. Tyto výsledky jsou velice slibné do budoucna.

E. Připomínky a otázky

- ✓ Vzhledem k tomu, že se autor v textu mnohokrát odkazuje na příložené články, považovala bych za vhodné, aby byly součástí práce.
- ✓ Jak jsem již psala výše, není sjednoceno číslování z obsahu ve vlastní práci
- ✓ Na straně 39, 2. řádek: zkratka AUCs není uvedena ve zkratkách, je nutno ji hledat v textu.

Otázky:

- ✓ Na straně 13, bod 1.1.2., 7. řádek autor píše, že makrofágy nejsou schopny zabít intracelulárně lokalizované mykobakterie. Mohl by vysvětlit proč?
- ✓ O 5 řádků níže se autor zmiňuje o latentním stadiu TB. I když z obrázku 1.1. vyplývá, že přímé faktory tohoto jevu nejsou známy, mohl by autor k tomuto problému sdělit nejnovější poznatky?
- ✓ Na straně 33, poslední věta, autor uvádí, že přesto, že v *in vitro* modelu dochází u komplexu NPs-RIF k zvýšené cytotoxicitě oproti RIF, tak se autor domnívá, že v *in vivo* modelu toxický efekt nebude signifikantní. Může autor sdělit, na základě čeho se tak domnívá?
- ✓ V *in vitro* modelu inkuboval autor infikované buněčné linie s NPs-RIF po dobu 5 dnů. Má zkušenost s jiným intracelulárním patogenem bakterií *Francisella tularensis* je taková, že infikované buňky se rozpadají již po 18 hodinách infekce a bakterie se uvolňují do okolí. Jak to vypadá v případě *M. tuberculosis* nebo *M. bovis*.
- ✓ Dále se chci zeptat kolik procent buněk inkorporuje NPs-RIF a jestli se RIF neuvolňuje do prostředí, v případě, že není komplex uvnitř buněk.

F. **Závěr a doporučení**

Výsledky získané ing. Troušilem jsou pozoruhodné, při jejich získávání vytvořil nový model studia účinků Atb nesených na nanočásticích a jak *in vitro*, tak *in vivo* výsledky dávají velkou naději na zlepšení léčby intracelulárně lokalizovaných patogenů.

Předložená disertační práce ing. Jiřího Troušila splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce a jednoznačně doporučuji její přijetí k obhajobě.

Hradec Králové

11. červan 2020



plk. gšt. doc. RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.