



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



Doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.  
RECETOX, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí  
Přírodovědecká Fakulta, Masarykova Universita  
Kamenice 753/5, 625 00 Brno  
[hofman@recetox.muni.cz](mailto:hofman@recetox.muni.cz)

**Posudek disertační práce Ing. Jakuba Opršala:**

## **VLIV FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ NANOMATERIÁLŮ A EXPOZIČNÍCH MÉDIÍ NA VÝSLEDKY TESTŮ EKOTOXICITY**

Disertační práce se zaměřuje na **velice aktuální a potřebné téma** (z vědeckého i společenského hlediska): hodnocení toxicity, ekotoxicity a rizik nanomateriálů. Vzhledem k boomu ve vývoji a použití nanomateriálů snad ve všech odvětvích lidské činnosti, je jasné, že je třeba urychleně vyvinout postupy, kterými budeme schopni testovat jejich vliv na živé organismy a vyhodnocovat jejich ekologická i zdravotní rizika. Je potřeba co nejdříve osvětlit, jak specifické vlastnosti nanomateriálů (velikost částic, povrchové vlastnosti apod.) doplňují a mění toxicitu látek, z nichž jsou složeny. Jednou z praktických výzev je to, že nano-charakter testovaných látek často činí postupy standardních metod OECD, ISO apod. nepoužitelné. Je tedy potřeba poznat, jak se liší chování nanočástic v ekotoxikologických testech od chování běžně testovaných chemikálií a jak toto ovlivňuje výsledky testů.

Předložená disertační práce míří do výše zmíněných témat a klade si za cíl definovat klíčové fyzikálně-chemické parametry nanomateriálů a testovacích medií, které ovlivňují výsledky ekotoxikologických biotestů, a minimalizaci jejich nežádoucích vlivů úpravou postupů. K tomu bylo ale potřeba získat modelové nanočástice a pořešit vhodné metody na jejich měření a charakterizaci (cíl 1). Dalším cílem bylo navrhnout změny v postupech biotestů tak, aby se odstínil efekt agregace částic (cíl 2a a 2b). Posledním cílem byla studie vlivu povrchových vlastností nanočástic (cíl 3).

Autor předloženou práci prokazuje **schopnost provádět výzkum, psát kvalitní odborný text, publikovat své výsledky v IF časopisech** (2 prvoautorské články s IF 2,8 a 0,3 a spoluautorství na 2 dalších člancích k tématu s IF 1,3 a 1,1) a prezentovat je na konferencích.

V práci uvedená **literární rešerše je velice čtivá, přehledná a přínosná**. Žel většina textu se týká detailů metod potřebných k charakterizaci nanočástic a testovacích organismů (str. 29 – 48). Tomu nejzajímavějšímu, na co by měla navazovat experimentální část, to je osudu nanočástic v prostředí a médiích a jejich působení na živé organismy je věnována menší pozornost (str. 23-28).



**Dotaz:** Studií toxicity anorganických nanočástic již existují stovky. Nebylo by možné z nich sestavit databázi ukazující vztahy mezi různými parametry, jako jsou vlastnosti media, velikost částic, chování v mediu apod.?

Jako modelové nanočástice byly primárně vybrány **nanočástice stříbra** a významná část práce se zabývá i jejich přípravou a charakteristikou. Plusem je, že o těchto částicích je již známo velmi mnoho – nanoAg je jedním z nejčastějších nanomateriálů vůbec. Mínusem je, že i poznatků o jejich ekotoxicitě je velmi mnoho a prokázat novost a originalitu získaných výsledků disertace může být těžké. Jako modelové nanočástice pro test s roupicí byly použity **nanočástice zinku**.

**Dotaz:** Proč byly zvoleny právě nanočástice stříbra? Proč anorganické nanočástice a proč zrovna stříbra? Nebyly ve hře i jiné, méně probádané nanočástice, a případně na čem jejich zvolení ztroskotalo? Proč nebyly nanočástice zinku zpětně zkoumány i v akvatických testech, aby bylo možné srovnání?

**Dotaz:** Proč byly nanočástice stříbra připravovány samotným autorem? Nebylo praktičtější je získat jinde (podobně jako později nanočástice ZnO) a ušetřené úsilí věnovat dalším cílům práce?

Po přípravě částic nanostříbra následovaly pokusy sledující jejich osud (**agregaci**) v demineralizované vodě a mediu pro test OECD s rybami. Pro studium nanočástic byly zvoleny **vhodné fyzikální a chemické metody** – postupy moderní, akceptované vědeckou komunitou a dominantně užívané ve studiích nanomateriálů.

**Dotaz:** Proč byla z osudu nanočástic sledována pouze agregace? Je to jediný či hlavní proces, který probíhá?

**Dotaz:** Které metody ze spektra vyzkoušených a v práci zmiňovaných metod by autor doporučil nejvíce pro další výzkumy této problematiky, případně jako rutinní sadu pro praktické testování nanočástic, tj. metody, které by bylo nutno provést při každém biotestu nanomateriálů?

Jako dva **exemplární akvatické biotesty** byly vybrány test s rybou *Danio rerio* a korýšem *Daphnia magna*. Pro další účely byly jako druhy přidány další dva druhy ryb. Jako **exemplární terestrický biotest** byl vybrán test s roupicí *Enchytraeus crypticus*, ale neprováděný v půdě ale **v agaru**.

**Dotaz:** Proč se autor zaměřil pouze na rybu a dafnii při výběru vodních testů? Logicky by se nabízelo mít v sadě i testy s rostlinami (např. řasový test či okřehek) a mikroorganismy (např. *Vibrio fischeri* či *Pseudomonas putina*). Jedná se o testy rutinně používané při hodnocení chemických látek a mající opět specifická media, kde by znalost interference s osudem nanočástic byla velmi žádoucí. Podobně tak u půdních organismů: pochopitelné je, že se výzkum zatím chtěl vyhnout tak komplikované matici jako je půda, ale i tak by se nabízela například žížala, mikroorganismy (*P. putina*, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter globiformis*) či rostliny (hořčice, salát), které lze provádět i v kapalném mediu.





**Připomínka:** Na str. 8 autor uvádí, že danio je konzument a dafnie je producent. Oba organismy jsou konzumenti, jen jiného řádu!

Po prvotních zjištěních, že chování nanočástic znemožňuje jejich smysluplné testování, byly zkoumány modifikace médií akvatických biotestů. Nelehce řešitelným problémem je, že různé faktory spolu interagují, např. aglomerace je koncentračně závislá, podobně jako výsledný toxický efekt. Výzvou je, jak tuto interferenci oddělit. Zdá se, že autoři našli řešení ve formě obměny médií v různých časových intervalech, čímž bylo ve všech koncentracích dosaženo podobné velikosti částic. **Toto řešení považují za jeden z hlavních přínosů celé práce.**

**Dotaz:** Častá obměna média v rybím testu se ukázala jako řešení udržující velikost částic (pseudozabránění další aglomeraci). Jak je ovšem takový postup slučitelný s praktickou proveditelností testů? A naopak jak se vzdaluje od průběhu expozice, jak by probíhal v reálném ekosystému po vstupu nanočástic?

U testu s roupicí na agaru se úsilí dominantně zaměřilo na co nejlepší **distribuci částic v agaru** a maximální předejití aglomeraci.

**Dotaz:** Jaký je názor autora na ekologickou relevanci testu s roupicí na agaru a vůbec jeho použitelnost pro jakékoliv vyhodnocení rizika testované substance? Domnívám se, že když se později u tohoto testu navíc ukazují těžkosti při distribuci do média a je nutno zvolit značné úsilí a speciální postup, aby se testovaná látka distribuovala v médiu, už se zcela vzdalujeme s tímto testovacím systémem jakékoliv reálné situaci jak na straně organismu, tak na straně chování látky.

**Dotaz:** Na str. 94 je uvedeno, že nebyl přístup k TEM, přičemž v předchozí studii s nanostříbrem jsou výsledky TEM obsaženy?

Vliv povrchové chemie u dvou různých nanočástic stříbra byl studován v testu buněčnou kulturou střevních epiteliálních buněk pstruha.

**Dotaz:** Na výsledcích křivek dávka odpověď je naznačeno jakoby dvojí zakřivení toxicity. Dá se nějak vysvětlit ze znalosti probíhajících procesů?

Za velice zajímavý a podnětný pro další výzkum považují experiment s **přestupem nanočástic přes membránu tvořenou buňkami RTgutGC**. Takové experimenty jsou přesně ty žádoucí, které umožní vhlédnout do probíhajících procesů a jejich mechanismů. Žel byl v tomto experimentu srovnáván pouze vliv teploty (4 a 19°C).

**Dotaz:** Jaké další faktory (mám na mysli zpět k fyzikálněchemickým parametrům nanočástic) by autor začal studovat pomocí tohoto experimentálního designu?



**K cílům práce a koncepci celé práce obecně:** Domnívám se, že klíčové je rozlišit, zda specifické (ve smyslu odlišnosti od ne-nano podoby stejné látky) chování či toxicita nanočástice je: a) to, co skutečně chceme určit, protože to bude podobně fungovat i v reálném ekosystému ať už se jedná o efekt primární (např. nanočástice je sama o sobě více toxická) či sekundární (např. nanočástice se méně/více dostává látku do organismu, více/méně uvolňuje toxickou formu látky ...), nebo b) artefakt vznikající v testovacím systému, například díky nereálně vysokým koncentracím či umělému složení testovacího média s vysokou iontovou silou.

Dotaz: Co je v tomto kontextu myšleno „negativním ovlivněním vypovídací schopnosti testů“ (str. 16)? Jaký je vlastně cílový stav - co vlastně chceme testovat u jakékoliv chemické látky a co u nanomateriálu? Změny, kterým podléhá nanočástice v prostředí (ať již reálný ekosystém nebo medium v testu), nemusí nutně spadat do případu b) výše. Může být naopak žádoucí, je v testu postihnout (viz rešerše v kap. 1.1.1). Představme si látku, která sice nebude nanočástice, ale bude mít několik mechanismů účinku a bude mít v médiu (a prostředí) osud, který bude modifikovat její toxické efekty, biodostupnost apod. Jaký je pak koncepční rozdíl mezi hodnocením toxicity takové látky a nanočástic? Bylo by velice pěkné, kdyby se autor pokusil při prezentaci rozčlenit faktory ovlivňující chování a toxicitu nanočástice např. takto: a) vnější (podmínky prostředí či media v testu) vs. vnitřní (velikost, chemismus nanočástice); b) relevantní (je potřeba je zahrnout do hodnocení osudu a toxicity v testu) vs. interference (umělé artefakty, které zkreslují výsledek testu a nemají co do činění ani s osudem v reálných podmínkách); c) případně další varianty; d) kombinace. Toto je jen návrh. Ocenil bych zkrátka jakékoliv koncepční „uklizení“ této problematiky.

**Dílčí cíle práce byly jednoznačně naplněny** a bylo to doloženo i publikací výsledků. Žel mám dojem, že **rámcový cíl práce** (definovat klíčové fyzikálně-chemické parametry nanomateriálů a medií, které ovlivňují výsledky ekotoxikologických biotestů) **nebyl a ani nemohl být uspokojivě naplněn**. Jedná se totiž o soubor několika svébytných experimentů, které sice mají společné téma testování nanočástic v ekotoxikologických biotestech, nicméně díky jejich odlišné koncepci a designu **nemohou společně jít po linii plnění ambiciózního rámcového cíle**. Z mnoha fyzikálně-chemických parametrů nanočástic jsou víceméně vybrány pouze dva: velikost částic a povrchový chemismus, ale vždy v jiné studii s jinými endpointy a jinými organismy. Tyto jsou vybrány a priori, bez důkladnější analýzy a srovnání s dalšími možnými faktory. Na str. 17 je uvedeno, že identifikace klíčových parametrů proběhla v „pilotních experimentech“. Lze se seznámit s jejich výsledky? Které další parametry kromě velikosti částic byly porovnávány?

#### Formální stránka

Po formální stránce práci nelze nic vytknout. Rozsah je úctyhodný, jsou obsaženy seznamy obrázků, grafů, tabulek i zkratk. Práce je přehledně členěna. Je jednotná a dobrá úprava a styl. Použití a formát citací je v pořádku. Nutno vyzdvihnout velmi kultivovaný jazyk, správnou míru odborné stylistiky a absenci překlepů.





Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



Trochu nesouhlasím s tím, že experimentální část je členěna dle cílů a v rámci každého je popsána metodika a pak tzv. „výsledková část“. Klasické rozdělení na výsledky a diskuse chybí. Tím je trochu zamaskováno, že diskuse je převážně vlastní hypotetizování a polemika nad výsledky, nikoliv kvalitní a rozsáhlá diskuse s výsledky jiných studií. Pěkná diskuse je např. na str. 91.

#### Shrnutí

Přes všechny výtky v posudku výše lze celkově práci považovat za přínosnou oboru. Výsledky byly publikovány v pěti mezinárodních časopisech (4 s IF) a prošly peer-review oponenturami. To vše ukazuje na vědecké schopnosti autora hodné titulu Ph.D.

Práci tedy **doporučuji** přijmout k obhajobě.

doc. RNDr. Jakub Hofman PhD.

## Oponentský posudek disertační práce

Ing. Jakuba Opršala

### Vliv fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů a expozičních médií na výsledky ekotoxicity

Těžištěm předložené disertační práce je vývoj metod, které umožňují testování ekotoxicity nanočástic a jejich aglomerátů. Souběžně jsou v práci navrženy nalezené vhodné způsoby charakterizace fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů včetně jejich chování v různých expozičních médiích. K charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností autor využil metody, které dají uspokojivé odpovědi k hledaným vlastnostem nanomateriálů. Jednalo se o metody DLS, SEM, AFM, XRD a další. K testování toxicity Ag NPs byly vybrány jako modelové organismy hrotnatka velká, dánío pruhované, kapr obecný. Pro testy toxicity ZnO NPs byla vybrána roupice bělavá, dalším testem byla cytotoxicita těchto nanočástic na buněčné kultuře enterocytů pstruha duhového.

Řešené téma popisuje současnou problematiku hodnocení a nastavení vhodných metod pro charakterizaci a biologické testování nanomateriálů. Vývoj nanomateriálů a jejich aplikace si žádá odpovědi na charakterizaci nanomateriálů a na jejich biologickou účinnost. Při biologickém testování musíme vycházet ze stávajících metod, které je nutné modifikovat pro testování nanomateriálů tak, abychom byli schopni odpovědět na otázku jejich případného biologického rizika.

Tohoto úkolu se autor zhostil velice dobře. Ve své rozsáhlé práci vycházel ze stávající metodiky OECD, která je určena pro testování ekotoxicity ve vodě rozpustných chemikálií.

Autorovi se podařilo vyvinout o otestovat nový postup testů ekotoxicity Ag NPs a jejich aglomerátů na vybraných biologických modelech. U nanočástic byla a je velkým problémem jejich aglomerace, kterou se snažil při svém testování zpomalit různými postupy tak, aby dosažené výsledky měly vypovídající a reprodukovatelný charakter.

Ještě složitější situace nastává v půdní matrici, kde mají na aglomeraci velký vliv půdní kyseliny. Pro tento způsob byla zavedena nová metoda testování na agarové půdě (jako expoziční médium), která potlačila aglomeraci zvolených ZnO NPs nanočástic. Jedná se o nově vyvinutou a zajímavou metodu.

Práce je zpracována přehledně s dostatečným množstvím literárních zdrojů, kapitoly na sebe logicky navazují. Při hodnocení disertační práce je nezbytné připomenout výsledky výzkumu, které se staly podkladem pro řadu publikačních výstupů a prezentací na konferencích, přičemž Ing. Jakub Opršal je autorem nebo spoluautorem 5 publikací s IF.

V práci se vyskytuje několik drobných nepřesností, které nijak nesnižují úroveň práce.

Str. 57 – kap. 2.1.4. - .... k testování ekotoxicity NPs na tomto zástupci z říše ryb – systematicky špatné zařazení – v tomto případě jsou Říši – Živočichové

Str. 76 – obrázek 15. který dokumentuje deformace plůdku – pro nezasvěceného čtenáře je vhodné vložit srovnávací fotografii zdravě se vyvíjejícího plůdku

Str. 96 – u přípravy expozičních gelů – v práci jsme nenašla specifikaci agarů – prosím o upřesnění

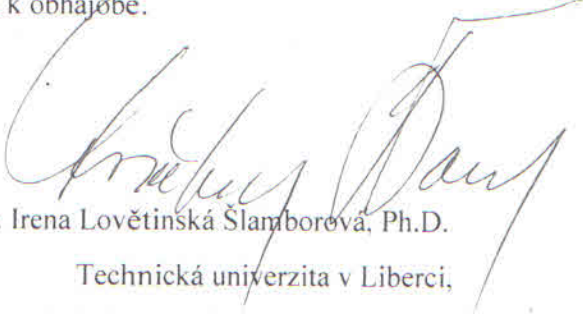
Str. 123 - Lysozomální membrány jsou v našich testech cytotoxicity nejcitlivější organelou .... – lysozom je organela, ale jeho membrána ne – jde spíše o formulační chybu

V rámci obhajoby disertační práce, prosím o odpovědi na následující otázky.

1. Jak si vysvětlujete nižší toxicitu  $Ag^+$  na enterocyty pstruha potočního (prosím o doplnění Vašeho vysvětlení v závěru – str. 130).
2. Jaká je perspektiva vámi modifikovaných a nově vyvinuté metody pro standardní testování toxicity nanočástic?

Práci jednoznačně **doporučuji** k obhajobě.

V Liberci 8. 9. 2016

  
doc. Mgr. Irena Lovětinská Šlamborová, Ph.D.

Technická univerzita v Liberci,  
Fakulta zdravotnických studií a KCH





Oponentský posudek na disertační práci

**VLIV FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ  
NANOMATERIÁLŮ A EXPOZIČNÍCH MÉDIÍ  
NA VÝSLEDKY TESTŮ EKOTOXICITY**

**AUTOR PRÁCE: Ing. Jakub Opršal**

Předložená disertační práce je zaměřena na problematiku stanovování ekotoxicity nanomateriálů, zejména nanomateriálů na bázi kovů. V předložené disertační práci se autor nejprve věnuje významné otázce související s výskytem nanomateriálů v jednotlivých složkách prostředí, a sice charakterizaci jejich základních fyzikálně-chemických parametrů. Autor v práci použil řadu pokročilých analytických postupů a instrumentální techniky. Hlavním těžištěm disertační práce je práce s testovacími organismy. Za testovací organismy byly zvoleny vodní organismy, hrotnatka *Daphnia magna*, danio pruhované *Danio rerio* a kapr obecný *Cyprinus carpio*. Ve všech pracech zaměřených na stanovení ekotoxicity nanomateriálů je třeba řešit problematiku aglomerace nanočástic. Autor disertační práce se této problematice věnoval velmi pozorně a řešil ji inovativním způsobem za využití agarového gelu jako kultivačního a expozičního média. V tomto případě však vcelku logicky použil jako testovací organismus půdní roupici *Enchytraeus crypticus*. Významnou a přínosnou částí práce je hledání vztahu mezi mírou účinku na organismus a mírou aglomerace částic. Tomuto odbornému tématu se autor věnoval i v testech na buňkách střevního epitelu pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss*. Autor práce ze získaných primární experimentální data a použil je pro vlastní zhodnocení. Značným přínosem práce je komplexní přístup v hodnocení.

Práce obsahuje řadu vlastních výsledků. Závěry práce jsou stručné a jasné a jsou v nich shrnuty konkrétní dosažené cíle. Disertační práce se skládá ze 139 stran textu a příloh, jež tvoří autorem v mezinárodních časopisech publikované práce. Disertační práce je sepsána v českém jazyce. Autor



prokázal schopnost publikovat vlastní výsledky v odborných časopisech. K předložené práci nemám žádné zásadní připomínky.

#### Otázky pro disertanta:

- Co je myšleno korigovanou mortalitou či korigovaným přežitím embryí?
- Jakým způsobem byly vypočteny indexy toxicity LC50 a podobně? V práci uvedená informace „určení LC50 bylo provedeno programem Toxicita“ nepovažuji za dostatečné. Jakou funkcí byly proloženy experimentální data? Na straně 74 se uvádí, že LC50 jsou uvedeny v tabulce 5, ale jsou až v tabulce 6. U hodnot LC50 by bylo vhodné doplnit intervaly spolehlivosti.
- Jaký počet opakování byl v jednotlivých experimentech proveden? Jsou rozdíly v % mortality např. tab. 9 signifikantní?

#### Závěr

Uchazeč prokázal schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu nebo vývoje dle § 47, odst. 4, zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách. Disertační práce obsahuje původní a uveřejněné výsledky a splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru.

Disertační práce Ing. Jakuba Opršala splňuje všechny náležitosti ve smyslu zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a dle čl. 31, odst. (10). Disertační práci Ing. Jakuba Opršala doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 30.8.2016

doc. Ing. Vladimír Kočí, PhD.

