

RNDr. Veronika Benson, Ph.D.
Laboratoř modulace genové exprese
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.
Vádeňská 1083
142 20 Praha 4

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Marcely Filipové s názvem „Studium buněčné toxicity vybraných nanočástic v tkáňových kulturách“

Mgr. Marcela Filipová předložila k oponentuře disertační práci, která se zabývá problematikou toxicity různých nanomateriálů po jejich interakci s endoteliálními buňkami HUVEC. Disertační práce má celkem 109 stran, je klasicky členěna na 8 kapitol a 3 přílohy. Zahrnuje všechny základní části: úvod, hypotézy a cíle práce, metody, výsledky, diskuzi, závěr a přehled citované literatury. Vlastní výsledky jsou uvedeny jak v textu, tak ve formě přiložených článků, kde je Mgr. Filipová spoluautorkou. Práce je psaná v odborném českém jazyce, ke kterému nemám až na pár překlepů výhrady. Autorka se důsledně odkazuje na použitou literaturu.

Práce je velmi čtivá, jednotlivé kapitoly jsou jasně a přehledně zpracované, text je plynulý a navazující. Zejména úvod je velmi podrobně zpracován a komplexně pojednává o jednotlivých nanomateriálech a projevech cyto-toxicity vzhledem k akutní i programované smrti. Velmi pěkně a komplexně je zpracováno téma interakcí nanomateriálu s plasmatickou membránou živých buněk. Práce obsahuje porovnání tří různých základních typů nanomateriálů, konkrétně hydrofilní křemíkové nanočástice (SiNP), superparamagnetické železité nanočástice a vícevrstevné uhlíkové nanotrubičky (CNT). Na modelu nanotrubiček autorka práci rozvádí o vliv složení proteinové korony na cyto-toxicitu trubiček i způsob, kterým je možné toxicitu snížit a umožnit využití těchto materiálů v biomedicínské praxi.

Aktuálnost zvoleného tématu

Předložená práce je dobře zasazena do současné potřeby výzkumu. S rozšířením nanomateriálů do praxe včetně jejich využití v biomedicině, je problematika bezpečného používání těchto nanomateriálů velmi aktuální. Autorka se dobře orientuje v dané problematice a disponuje širokým všeobecným přehledem, což dokazuje rozsáhlý úvod této práce i velmi pěkně napsaná diskuse a publikování příspěvků na dané téma.

Cíle disertační práce, zvolené metody a výsledky

Cílem práce bylo vytvořit komplexní, vícesložkový test (tzv. CDS assay) pro odhad nano-toxicity, změřit

toxicitu tří exemplárních nanomateriálů, a navrhnout povrchovou modifikaci snižující toxicitu karbonových nanotrubiček.

V samostatné kapitole jsou jasně uvedeny jak hypotézy, tak i jednotlivé dílčí cíle práce. Metodiky i výsledky jsou povětšinou jasně popsány, diskuze je navazující a srozumitelná. Souhrnně je práce založena na třech hypotézách řešených v rámci šesti dílčích cílů. V závěru práce jsou jasně uvedeny výsledky dílčích cílů a potvrzení hypotéz. Trochu rušivý je fakt, že hypotéza 1 obsahující vývoj CDS testu by měla teoreticky předcházet hypotéze 3, ale data byla publikována v opačném sledu (nejdříve z hypotézy 3 v roce 2014 a poté z hypotézy 1 v roce 2018).

Komentář

V práci oceňuji snahu o implementaci komplexního testu, který je dostatečně jednoduchý, aby mohl být osvojen většinou laboratoří a snížila se tak variabilita hodnocení cyto-toxicity nanomateriálů. Navržený CDS assay se skládá z: WST-8 testu, LDH testu a mikroskopické analýzy intaktních jader a apoptotických tělísek. Bohužel využití konkrétně LDH a WST testů je limitované typem studovaného materiálu vzhledem k možné interferenci, na kterou autorka v práci rovněž upozorňuje v případě karbonových nanotrubiček.

Celkově hodnotím práci jako pěkně psanou, zajímavou a poučnou. K výsledkům a metodám mám několik výhrad:

Vzhledem k tomu, že k detekční reakci (LDH i WST) dochází v kultivačním médiu, referenční spektra jednotlivého nanomateriálu, která se budou používat pro odpočet pozadí, by měla být měřena v médiu, což autorka správně uvádí v kapitole 3.6.3, ale ve vlastních výsledcích (obrázek 14) jsou uvedena spektra nanomateriálu rozpuštěného ve vodě.

U obrázku 4 by bylo dobré zahrnout detailnější foto, u nanočástic A a B lze těžko rozpoznat/hodnotit jejich tvar. Stejně tak obrázek 20 je velmi tmavý a jednotlivé buňky nebo jejich náznaky nelze zvláště po aplikaci nanočástic rozlišit. Míru internalizace lze naštěstí posoudit z TEM analýzy na obrázku 21.

Jak autorka uvádí v kapitole 4.2.1, WST-8 poukazuje na aktivitu buněčných dehydrogenáz. Do jaké míry je tedy reprezentativní odběr supernatantu? Je zde předpoklad, že množství „barvičky“ uvolněné do supernatantu reálně odráží množství produkované v buňce? Chybí mi porovnávací experiment nebo citace metody, protože klasicky (i v protokolu výrobce) se měří celý vzorek včetně buněk. Odebrání nebuněčné složky by našlo využití například u buněk rostoucích na materiálu, jehož vlastnosti interferují s měřením absorbance.

Není uvedeno složení EGM-2 média. Předpokládám, že byl použit komerční doplněk k tomuto médiu, který obsahuje 2% FBS. Neinterferuje také tato koncentrace séra s testem LDH? Výrobce právě z důvodu interference doporučuje používat FBS o koncentraci 1%.

Splnění podmínek samostatné tvůrčí vědecké práce

Předložená disertační práce je založena na výsledcích publikovaných v časopisech PLOS One a Nanomedicine a dosud nepublikovaných datech. Jako celek splňuje podmínky samostatné tvůrčí vědecké práce. Publikace uvedené jako podklad této práce zahrnují dva původní články v již zmíněných impaktovaných časopisech (jeden prvoautorský) a jeden český přehledný článek v impaktovaném časopise. Vedle těchto publikací autorka ještě disponuje dalšími čtyřmi články v impaktovaných časopisech a jedním recenzovaným článkem v angličtině bez IF.

Závěr

Na základě posouzení předložené práce z hlediska její vědecké úrovně, přístupu řešení a výsledků, konstatuji, že disertační **práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné, tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.**

Otázky:

1. Karboxylace CNT způsobila změnu morfologie CNT. Proč, jakým způsobem k sobě CNT v původní a modifikované formě drží?
2. Obrázek 6B. Jak lze vysvětlit (pokud je možné) vznik populace SiNPs s menším hydrodynamickým průměrem u vzorků inkubovaných v médiu?
3. Obrázek 15 a 16. Hodnoty v koncentraci nanomateriálu 100µg/ml v obrázku 15 a hodnoty po 24 hodinách uvedené na obrázku 16 by měly být cca stejné. V řadě hodnot to tak není. Jak přistupovat k těmto rozdílům při hodnocení cytotoxicity?
4. Snížení toxicity povrchovou modifikací je z mého pohledu důležitý fenomén s širokým uplatněním. V této práci zvláště HSA korona vypadá, že redukuje míru apoptózy, přestože viabilita je celkově stále nízká. Za vyšší toxicitou často stojí i velikost částic a u karbonových nanočástic i vysoká hladina sp² konformace. Lze u CNT, které jsou na sp² ze své podstaty bohaté, tento parametr nějak upravit? Jaké může být reálné využití CNT z hlediska jejich výhod proti již existujícím a méně toxickým nanočásticím?

V Praze, 8. ledna 2020