



## Oponentský posudok na diplomovú prácu

**Meno posudzovateľa:** Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.

**Autor:** Bc. Dominika Dostálová

**Názov práce:** Vplyv nanočastíc na funkčné a regeneračné vlastnosti mezenchymálnych kmeňových buniek

**Ciele práce:** Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bolo zhodnotiť vplyv nanočastíc (nanoparticles, NP) na funkčné a regeneračné vlastnosti mezenchymálnych kmeňových buniek (mesenchymal stem cells, MSC). Jednotlivé ciele boli: testovanie vplyvu NP na metabolickú aktivitu, diferenciačný potenciál, expresiu imunoregulačných molekúl, produkciu cytokínov a imunoregulačné vlastnosti MSC *in vitro*. Autorka si tiež dala za cieľ skúmanie vplyvu nanočastíc striebra (Ag NP) na regeneračný potenciál MSC *in vivo*, ktorý bol skúmaný na myšom modeli poranenia kože.

Celkovo sa jedná o zaujímavú a dôležitú oblasť výskumu, ktorá má presah do regeneratívnej medicíny.

**Štruktúra (členenie práce):** Členenie práce je štandardné, práca obsahuje všetky požadované časti. Rozsah práce: 67 strán vlastného textu.

### Literárny prehľad:

Literárny prehľad je rozdelený do šiestich podkapitol, a to nasledovne: 1) Kmeňové bunky, 2) Mezenchymálne kmeňové bunky, 3) MSC a ich úloha v regenerácii tkanív, 4) Bunková terapia pomocou MSC a jej limitácie, 5) Nanomateriály a NP, 6) Vplyv NP na SC. Literárny prehľad zodpovedá téme práce, je napísaný zrozumiteľne a prehľadne, ale autorka by sa podľa môjho názoru mohla venovať niektorým oblastiam podrobnejšie. Záverečným cieľom v diplomovej práci bolo pozorovanie vplyvu Ag NP na regeneračný potenciál MSC v myšom modeli poranenia kože. Bolo by vhodné, aby podkapitola 2.3 MSC a ich úloha v regenerácii tkanív obsahovala na úvod aj podrobnejší popis procesov, ktoré prebiehajú pri samotnej regenerácii tkaniva. Ďalej napr. v podkapitole 2.5 venujúcej sa nanomateriálom a NP by bolo vhodné detailnejšie uviesť túto časť. Autorka napr. na str. 22 konštatuje: „*Pre jedinečné vlastnosti našli NP uplatnenie v rôznych oblastiach, vrátane biomedicínskych aplikácií, prísad v potravinárstve, zdravotníctve, kozmetickom priemysle a iných (prehľad v (Khan et al., 2019)).*“ Bolo by vhodné tieto jedinečné vlastnosti bližšie špecifikovať.

Autorka v práci použila dostatočný počet literárnych zdrojov (156), z nich je 77 od roku 2017. V práci bolo použitých 8 súhrnných článkov (review), ale tie neboli v zozname literárnych zdrojov označené. V niekoľkých prípadoch nie sú uvedené citácie: str. 23: „*Antibakteriálne pôsobenie NP je založené na vstupe NP do cytoplazmy, tvorbe ROS a následnom poškodení DNA či proteínov (Obrázok 5).*“; str. 58: „*Predchádzajúce štúdie ukázali, že MSC aj Ag NP sa javia ako perspektívne prostriedky pre využitie v regeneratívnej medicíne. MSC sú vhodné pre ich imunoregulačné a diferenciačné vlastnosti, ktorými sa môžu podieľať na regenerácii tkanív, a Ag NP sú využívané vďaka svojím antibakteriálnym vlastnostiam.*“; str. 61: „*Typickou vlastnosťou niektorých kovových NP je ich antibakteriálny potenciál.*“; str. 62: „*Okrem veľkosti môže zohrávať dôležitú úlohu aj zloženie NP, ktoré môže odlišne vplyvať na metabolické dráhy v bunke.*“; str. 63: „*Najvýraznejší pokles expresie pre analyzovanú molekulu bol pozorovaný u TiO<sub>2</sub> NP, čo môže byť spôsobené veľkosťou NP a následne ich rýchlejším vstupom do buniek, keďže nami použité TiO<sub>2</sub> NP mali veľkosť častíc < 10 nm v porovnaní s Ag NP < 150 nm a CuO < 50 nm.*“.



## Materiál a metódy:

Autorka sa v priebehu vypracovania diplomovej práce oboznámila s viacerými metódami a odviedla veľké množstvo práce. Metódy korešpondujú so zadanými cieľmi práce. Celkovo je kapitola napísaná zrozumiteľne a prehľadne. V texte je vhodne začlenená Tabuľka 2, kde sú prehľadne uvedené koncentrácie jednotlivých NP, ktoré sa používali pre daný typ experimentu. Na Obr. 7-9 sú prehľadne znázornené schémy jednotlivých pokusov s použitím programu BioRender.com.

K textu uvádzam pár pripomienok. Čo sa týka použitia pokusných zvierat, chýba uvedenie informácií o ich pôvode, podmienkach chovu, type krmiva. V zozname chemikálií a priemyselne pripravených činidiel by bolo vhodné uviesť aj katalógové číslo jednotlivých NP. V podkapitole 4.2.1 Izolácia a kultivácia MSC chýba popis ukončenia pôsobenia trypsínu. V podkapitole 4.3.3.4 Izolácia splenocytov a ich kultivácia s MSC je uvedené: „*Odobraná slezina bola nastrihaná v kompletnom RPMI 1640 médiu na uvoľnenie splenocytov. Suspenzia bola prefiltrovaná a centrifugovaná (8 min, 170 g, RT).*“ Predpokladám, že daný popis nie je úplný a dané tkanivo bolo ešte homogenizované.

## Výsledky:

Celkovo sú výsledky prehľadne zdokumentované, ale k tejto kapitole mám výhrady, ktoré sa týkajú absencie experimentov, v ktorých by sa zisťoval vplyv NP na cytotoxicitu, resp. proliferáciu MSC a splenocytov. V dôsledku toho si myslím, že jednotlivé experimenty nemôžu byť vždy správne vyhodnotené a interpretované. Autorka môže prežívanie buniek iba čiastočne odvodiť z testu metabolickej aktivity, ktorý aj tak v práci interpretuje, že podľa týchto výsledkov boli zvolené optimálne koncentrácie NP pre analýzu funkčných vlastností MSC. Ale to podľa mňa nie je dostatočné, keďže chýba celkový poznatok o procesoch v danej bunkovej kultúre. Potreba týchto výsledkov je pre prácu zásadná, pretože, ak dochádza k zastaveniu proliferácie, resp. k signifikantnému zníženiu viability, tak to má zásadný vplyv na expresiu a produkciu cytokínov, rastových faktorov a celkový stav buniek. Autorka v práci zmieňuje vplyv NP na bunky, ale, žiaľ, do prevedenia jednotlivých experimentov to nebolo úplne premietnuté. Pri konc. 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pre Ag NP a konc. 0,8 pre CuO NP bola pozorovaná signifikantne znížená metabolická aktivita (viac ako o polovicu), čo znamená, že by mohlo dochádzať k ovplyvneniu bunkového cyklu, zastaveniu proliferácie, resp. k cytotoxickému účinku jednotlivých NP, takže interpretácia daných výsledkom nemusí byť relevantná. Konc. 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pre CuO NP by mala byť zvolená na základe výsledkov z experimentov a nie iba ako dedukcia z použitia vyššej koncentrácie (0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), kde už bol pozorovaný signifikantne znížený vplyv na metabolickú aktivitu.

## Diskusia:

Diskusia má 6 strán, celkovo je na dobrej úrovni, ale premietajú sa do nej pripomienky z výsledkovej časti, a tak môže dôjsť k nesprávnej interpretácii výsledkov a ich porovnávaní a diskutovaniu s odbornou literatúrou.

Napr. na str. 63 a 64 je uvedené: „*Ďalšou testovanou molekulou bola IDO1, ktorej expresia na génovej úrovni bola zvýšená po kultivácii s Ag NP a CuO NP, čo môže naznačovať zmeny v proliferačnom a diferenciačnom potenciále MSC. Ako bolo ukázané v publikovanej štúdií, práve zvýšená expresia IDO1 po kultivácii s IFN- $\gamma$  viedla k zníženej proliferácii a diferenciácii MSC v adipocyty a osteoblasty (Croitoru-Lamoury et al., 2011).*“ Jedná sa o použitie už vyššie zmienených koncentrácií, pri ktorých dochádza k signifikantnému (viac ako polovičnému) poklesu metabolickej aktivity, a teda je otázne, do akej miery je možné dané výsledky správne



interpretovať. Podobne je obťažné správne interpretovať aj nasledujúce tvrdenia: str. 64: *“Produkcia týchto cytokínov zostala pravdepodobne nezmenená, pretože sú produkované konštantne a NP ovplyvňujú MSC až po dlhšej dobe. Produkcia LIF bola zvýšená po kultivácii s Ag NP alebo CuO NP. Tento jav môže byť spôsobený tým, že produkcia tohto cytokínu je minimálna a zvýšená produkcia je indukovaná zápalovým prostredím, ktoré môže aktivovať odlišné dráhy.”*; str. 64-65: *„Naopak po kultivácii splenocytov s MSC ovplyvnenými Ag NP v koncentrácii 25 µg·ml<sup>-1</sup> (v pomeroch 4 : 1 a 8 : 1; splenocyty : MSC) mala produkcia IFN-γ trend zníženia. Tento efekt neodpovedal našej hypotéze, že imunoregulačné vlastnosti MSC sú oslabené po kultivácii s NP. Tento jav mohol byť spôsobený prítomnosťou NP, ktoré boli do kultúry splenocytov uvoľnené z MSC. Avšak nebolo možné kvantifikovať množstvo NP v kultúre.”*; str. 65: *„Z toho vyplýva, že trend zvýšených imunopresívnych vlastností MSC po kultivácii s Ag NP (25 µg·ml<sup>-1</sup>) môže byť spôsobený Ag NP prítomnými v kultúre.”*

### Záver:

V závere sú prehľadne zhrnuté výsledky, ktoré korešpondujú so zadanými cieľmi práce.

### Formálna úroveň práce (obrazová dokumentácia, grafika, text, jazyková úroveň):

Práca je písaná v slovenčine, celkovo po formálnej stránke na veľmi dobrej úrovni s minimom preklepov a chýb. Autorka v práci použila pri obrazovej dokumentácii program BioRender.com, pomocou ktorého (okrem iného) vhodne začlenila do metodickej časti schémy jednotlivých pokusov.

Pripomienky: 1) v číslovaní niektorých podkapitol došlo k chybe. Číslo podkapitoly 2.5.3 je nesprávne uvedené a malo by byť 2.5.1, podobne je to u podkapitoly s číslom 4.3.3 namiesto, ktorého by malo byť 4.3.1 a 4.3.7.6, namiesto ktorého by malo byť uvedené 4.3.7.1.; 2) na str. 15 je nesprávne uvedený ligand pre chemokínový receptor (namiesto CCL7 by malo byť správne uvedené CCL27); 3) gramatické chyby (namiesto „y“ má byť správne „i“) na str. 23: *„...denne sú ľudia vystavovaný...”* a str. 63: *„...v adipogénnom potenciály MSC...”*.

### Otázky:

- 1) V diskusii na str. 64 je uvedené: *„... TNF-α (typický pre B lymfocyty)...”*. Je dané tvrdenie správne, aké bunky ho produkujú?
- 2) Na str. 24 je uvedená táto veta: *„Štúdia zameraná na transkriptomickú analýzu ESC po pôsobení Ag NP odhalila najväčšie zmeny v expresii génov pre embryonálny vývoj a metabolizmus (Gao et al., 2017).”* V diskusii na str. 64 píšete: *„Pre vylúčenie možnosti, že NP zasahujú do expresie Gapdh, ktorý bol využitý ako referenčný gén na stanovenie relatívnej génovej expresie. Vzorky boli porovnané aj s referenčným génom pre β-aktín. Výsledky ukázali, že expresia Gapdh nebola zmenená v prítomnosti NP (výsledky nie sú zobrazené).”* Aké postupy boli zvolené pre určenie referenčného génu, aby sa vylúčila jeho variabilita, keďže enzým, ktorý kóduje je zapojený v metabolických dejoch? Uvedte hodnoty pre jednotlivé Ct a štandardné odchýlky.
- 3) Prosím, interpretujte Vaše výsledky v kontexte pripomienok k výsledkovej časti a taktiež v súvislosti so znalosťami z odbornej literatúry, ktoré sa týkajú ovplyvňovania bunkového cyklu a proliferácie (a následne cytotoxicity) vybranými NP. Aké ďalšie skupiny génov môžu byť ovplyvnené pôsobením kovových NP (zamerajte sa na odborné práce s použitím RNASeq metódy)?
- 4) Na str. 20 je uvedené: *„Do januára 2022 bolo zaregistrovaných viac ako 1330 klinických štúdií skúmajúcich terapeutický potenciál MSC (ClinicalTrials, 2022). Čína, Spojené štáty americké a Európa mali najväčšie zastúpenie v klinických štúdiách s MSC s 260, 253 a 240 výskumami. Avšak len < 1 % (8) štúdií bolo vo fáze 4. klinického testovania.”* Zosumarizujte v danom kontexte výskum v oblasti MSC za posledné roky, podobne aj



používání NP. Obidvom oblastiam sa prisudzoval veľký význam, aký je Váš pohľad na súčasný stav poznania?

**Splnenie cieľov práce a celkové hodnotenie:**

Autorka splnila stanovené ciele práce. Celkovo sa jedná o veľmi dobrú prácu s relevantným zameraním, ale s určitými nedostatkami. Prácu samozrejme odporúčam na obhajobu a to s celkovým hodnotením veľmi dobre.

Dátum: 30.5.2022

Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.