



## OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

*NÁZEV PRÁCE: Nanočástice a jejich vliv na imunitní systém: Studium prozánětlivého potenciálu vybraných karbonových nanomateriálů*

*AUTORKA: Mgr. Tereza Švadláková*

Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium velmi aktuální problematiky uhlíkových nanomateriálů (= CNMs), a to konkrétně dvou typů grafenu a mnohostěnných uhlíkových nanotrubiček (MWCNTs). U těchto materiálů bylo cílem charakterizovat jejich biologický efekt u dvou buněčných modelů - primárních monocytů izolovaných z periferní krve dárce a THP-1 makrofágové linie. Vzhledem k tomu, že CNMs jsou stále více v rámci lidské činnosti využívány v průmyslu, medicíně či vědecko-výzkumné oblasti, je důležitost studovaného tématu zřejmá. Disertační práce je sepsána v souladu s definovanými cíli, jimiž u vybraných typů buněk byla stanovení: 1) cytotoxicity CNMs, 2) produkce cytokinů po inkubaci s CNMs, 3) imunomodulačních účinků CNMs.

Disertační práce je členěna dle klasického formátu, kdy je nejprve zpracována teoretická část, a poté následují části týkající se cílů, použitých metodik, výsledky, diskuze a závěr. Text práce je sepsán velmi čtivě, srozumitelně, stylisticky bez jakýchkoliv nedostatků, a je nutné vyzdvihnout velmi malé množství překlepů, resp. v celém textu jsem postřehl pouze čtyři. Toto svědčí o velmi pečlivé práci na vlastním textu. Citační normy byly splněny, ačkoliv drobným nedostatkem může být např. střídání zkratk a plných názvů časopisů v Seznamu literatury, resp. (ne-)uvádění čísel stran u citací. Toto ale nijak nesnižuje celkově vynikající dojem ze sepsaného textu.

V teoretické části autorka v souladu s prvním cílem zpracovala na 18 stranách detailní popis současného stavu znalostí o typech CNMs a jejich vlastnostech ovlivňujících imunitní systém. Lze ocenit, že většina obrázků je nakreslena v programu *Biorender* (pravděpodobně autorkou) a je tak přesně odpovídající v dané kapitole uváděnému tématu. Metodická část podrobně popisuje experimentální kroky, které byly postupně prováděny k dosažení stanovených cílů. Popis některých metod je doplněn i o dosažené výsledky.

Výsledková část se skládá z částí odpovídajících cílům. Nejprve jsou charakterizovány fyzikálně-chemické vlastnosti CNMs, dále pak jejich disperze. V další části jsou prezentovány

výsledky testování biologických účinků CNMs u vybraných buněčných modelů, tj. intracelulární lokalizace, cytotoxicita, indukce produkce cytokinů, a následně jsou cíleně charakterizovány cesty aktivace inflammasomu NLRP3. K tomuto účelu byly použity také geneticky modifikované buněčné linie, což jen potvrzuje mechanistický přístup při vypracování celé DP. V poslední kapitole výsledkové části jsou uvedeny výsledky z testování imunomodulačních vlastností CNMs, kdy u obou buněčných modelů bylo k tomuto účelu využito stimulační v přítomnosti tří kmenů bakterií. Výsledky jsou následně podrobně diskutovány a lze ocenit, že jejich finální zhodnocení není provedeno pouze porovnáním vůči výstupům studií ostatních autorů, ale i v rámci popisu limitací použitých metod, resp. dosažených výsledků. V Závěru jsou výstupy disertace shrnuty.

Většina výstupů uvedených v DP byla publikována v několika původních vědeckých pracích v časopisech s IF, u nichž je doktorandka hlavní autorkou (2 práce), nebo spoluautorkou (2 práce). Dále je Mgr. Švadláková uvedena v autorském kolektivu u dalších 6 odborných prací uveřejněných v časopisech s IF a u jedné práce v časopisu bez IF, což jen prokazuje její velmi vysokou vědecko-výzkumnou aktivitu během PGS. Své výsledky prezentovala na 3 konferencích, vč. zahraničních, jako hlavní autorka, a to 1x formou přednášky a 2x formou plakátového sdělení.

K práci mám následující dotazy a drobné komentáře:

#### Dotazy:

1) Jak opakovaně uvádíte, ke stabilizaci dispergace obou vzorků grafenu jste použili cholát sodný o dané koncentraci. V textu práce např. uvádíte, že koncentrace cholátu u buněk byla 0,004% (str. 41), popř. 0,02% (str. 32). Při studiu dispergace obou vzorků grafenu pomocí DLS (str. 48, obr. 21) v daném prostředí máte uvedeno, že zde byla studována dispergace v destilované vodě, resp. kultivačním médiu. Znamená to, že při stanovení dispergace obou vzorků grafenu pomocí DLS cholát použit nebyl? A s výše uvedeným souvisí i druhá otázka, zda byla koncentrace cholátu při pokusech na buňkách stále stejná?

2) Jakou výslednou koncentraci měly vzorky grafenu testované pomocí DLS (str. 48, obr. 21)? V experimentální části je k tomuto uvedeno (str. 33), že „...suspence byly 10x zředěny...“ ale není uvedena výsledná testovaná koncentrace vzorků. Je známo, že koncentrace analytu ovlivňuje tvorbu aglomerátů, a proto na obr. 21 prezentovaná data, resp. dispergace vzorků grafenu v buněčném médiu, pak může být odlišná, pokud nespadá do rozpětí koncentrací 0-60 µg/mL testovaných u buněk.

3) Ke stanovení koncentrace produkovaných cytokinů jste u některých z nich využili systémy reportérových buněk, u jiných standardní metodu ELISA. Nabízí se otázka, proč jste nepoužili pouze jediný metodický přístup pro stanovení koncentrace cytokinů, resp. jaké tyto dva principy stanovení koncentrací cytokinů mohou mít odlišnosti (senzitivita, ne/výhody, apod.)?

4) Máte nějaký návrh vysvětlení různých výstupů z testování modulační produkce cytokinů po inkubaci s CNMs po stimulaci bakteriálními kmeny, kdy u THP-1 linie a primárních monocytů bylo dosaženo odlišných výsledků?

5) V Tabulce 1 (str. 31) uvádíte výsledky elementární analýzy. Ačkoliv je v obou vzorcích grafenu prokázána přítomnost cca 5-7 % kyslíku, přesto jsou vzorky považovány za grafen, a ne za oxid grafenu. Proto se nabízí otázka, jestli v literatuře existuje nějaká hranice % zastoupení kyslíku, kdy je následně vzorek považován již za oxid grafenu, a ne grafen?

Připomínky formálního charakteru:

- v textu opakovaně používáte výraz „karbonové nanomateriály“. Možná by ale bylo lepší volit častěji používané označení „uhlíkové nanomateriály“

- názvy enzymů mají být dle české nomenklatury psány dohromady, čili „laktátdehydrogenáza“, aj.

- na obr. 26-29 prezentované výsledky z testování aktivity LDH by pravděpodobně měly mít minimální hodnotu 0 %, aby prezentovaná data měla biologický smysl.

Závěrem shrnuji, že Mgr. Tereza Švadlaková během zpracování své disertace využila celou řadu pokročilých bioanalytických postupů a prokázala schopnost systematické vědecké práce. Její výsledky poukazující na imunomodulační vlastnosti uhlíkových nanomateriálů mohou být velmi významné pro další výzkum v rámci této problematiky. Protože všechny kladené cíle disertační práce byly splněny, a to včetně požadované publikační aktivity, **doporučuji předloženou disertační práci k obhajobě.**

V Pardubicích 5.6.2022

---

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.