

Universita Karlova v Praze
1.lékařská fakulta
Ústav dědičných metabolických poruch
přednosta: Prof. MUDr. Viktor Kožich, CSc.

Pracoviště B
Ke Karlovu 2
128 08 Praha2
tel.: +420 224 967 679
fax: +420 224 967 119

Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Jany Šemberové

nazvané „Nanotechnologie v intenzivní péči: Intravaskulární biokompatibilita uhlíkových nanomateriálů – uhlíkové nanotuby a krevní destičky.“

Předložená disertační práce má klasické uspořádání, rozsah 71 stran včetně seznamu literatury a 11 příloh. Práce je uvedena přehledem znalostí o uhlíkových materiálech a jejich testování v biologických systémech, jenž je tematicky členěn a směřován tak, aby uvedl v práci dále popisované výsledky. Přehled je napsán pěkně, obsažně a čtivě (místy až vědecko-populárně). Materiálová a metodická část je napsána stručně a přehledně s řadou citací na již publikované metody. Získané a v práci uvedené výsledky se staly součástí čtyř publikací v zahraničních odborných časopisech s impakt faktorem a pěti konferenčních příspěvků. U jedné z těchto prací (té s největším impakt faktorem – 12,186) je Jana Šemberová uvedena jako první autorka a u dalších na předních místech. Je tedy zřejmé, že se Jana Šemberová významně podílela na výsledcích a sepsání těchto publikací. Oponent má v takovém případě výrazně jednodušší roli, protože výsledky i z nich vyvozované závěry již úspěšně prošly přísným recenzním řízením.

Z komentářů a otázek, které jsem si při čtení poznamenala, vybírám:

1. V úvodu se objevují některé fyzikální termíny, které ale nemusí být čtenářům z jiných oborů vždy jasné, proto bych navrhovala jejich vysvětlení. Např. co se myslí pod pojmem „aspekt ratio“, atp.
2. Na str. 15 ve druhém odstavci nerozumím, co chtěla autorka říci větou – „ Cells have been shown to grown on CNTs without excessive adhesion, potentially giving rise to applications such as tissue scaffolds, coatings for prosthetics..., vascular device and.... Myslím, že právě naopak tkáňové nosiče (scaffolds) pro svoji úspěšnost potřebují, aby na ně buňky maximálně adherovaly, zatímco cévní zařízení by měla být antiadhezivní.
3. V úvodu mi chybí nějaká informace o vápníku, jeho pohybu v buňce a různých jeho přenašečích. O systému SOCE je sice zmínka v sekci Výsledky, ale přišla by mi užitečnější už v úvodu.
4. Sice je v úvodu zmínka o PAMAM, ale chybí mi nějaká podrobnější informace v textu, čím přesně se liší ty čtyři generace a co je na nich zajímavého, že byly použity v této práci zabývající se primárně nanotubami a jinými uhlíkovými materiály.
5. Uvítala bych obrázky dotplotů FSC/SSC, podle kterých byla analyzována populace celých buněk a populace mikropartikulí, protože ty se od sebe budou výrazně lišit. Současně podrobnější popis, jak byl FACS nastaven předtím než se sbíraly jednotlivé fluorescenční kanály a ty dále analyzovaly.
6. Je možné FACSem (FCS/SSC) vidět aglomeráty M60, když jsou vhodným nastavením vidět mikropartikule uvolňované z buněk (velikost by měla být obdobná)?

7. Byla integrita buněčné membrány také testována pomocí FACSové analýzy propidium iodidem obarvených buněk inkubovaných s nanotubami? Opravdu nanotuby nezpůsobí díry (byť i přechodné) do membrány?
8. Proč nejsou na obrázku 8 (např. g) vidět i nanotuby, které vlezly do buňky a tím ji aktivovaly? Neleží spíše nanotuby pod buňkou?
9. Na obrázku 12 je znázorněna fluorescence dvou různých látek a hovoří se o jejich kolokalizaci. Jde opravdu o potvrzenou kolokalizaci konfokálním mikroskopem a následným vytvořením kolokalizačních map nebo se může jednat pouze o překryv barviček nacházejících se v různých Z-rovinách buňky, které se ale jeví v normálním mikroskopu jako překrývající se?
10. Je známo něco o úloze mitochondrií ve vápníkové homeostázi u krevních destiček nebo krevní destičky na ukládání vápníku používají jenom DTS?
11. Z jakého důvodu se v části práce objevují PAMAM, když většina práce je zaměřená na uhlíkové nanotuby, které jsou od PAMAM diametrálně odlišné a nedají se s nimi porovnávat. Dají se třeba PAMAM porovnávat s fullereny, které ale překvapivě nemají vliv na agregaci destiček zatímco PAMAM ano?
12. Obrázek 13 – A – je velmi malý a těžko se dá odlišit, co je přerušovaná čára a co plná (ve vlastní publikaci je to již více zřetelné). Jak vypadá kontrola (CTRL) tímto zobrazením (histogram), ta mi tam k porovnání výsledků chybí.
- B – proč vypadá dotplot stejně pro pozitivní i negativní kontrolu (i stejné procento buněk v PLT regionu)?
13. Jaký je rozdíl mezi indikátory Fura-2, AM a Fura FF/AM a proč byly použity na dané pokusy právě tímto způsobem, jak je uváděno? Detekují sondy i vápník v organelách nebo jen v cytosolu?
14. Je možné, že by byly destičky aktivované „zvenku“ pouhým přímým kontaktem s nanotubami a ovlivněním membránových receptorů pro adhezi?
15. Supplement B – obrázek 1 – Proč velikost C60 na obrázku z TEM nekoresponduje s velikostí uvedenou v tabulce na další straně?

Celkově je práce pěkná, stručně a dobře sepsaná. I když mi přijde, že výsledků je prezentováno poskrovnu, že jsou ukázány jen výsledky stěžejní, které se přesně v dané podobě nacházejí v příložených publikacích. Protože publikace jsou vždy vícedisciplinární – příprava a charakterizace testovaného materiálu a jeho biologické testy, tak bych ve vlastní práci sepsané pouze autorkou očekávala více biologických výsledků, které musela určitě udělat, aby dosáhla publikovaných finálních výstupů.

Nehledě na drobné připomínky, které spíše znamenají, že jsem si práci přečetla se zájmem a že mě svým způsobem i obohatila, práci doporučuji k přijetí jako práci doktorskou.

30. července v Praze

Marie Kalbáčová

