

<b>Posudek na bakalářskou práci</b>	
<input type="checkbox"/> školitelský posudek <input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Radovan Fišer Datum: 30.5.2018
Autor: <b>Pavčina Javorová</b>	
Název práce: Biomolekulární korona u Si a Au nanočástic a jej vliv na interakci s bunkami	
<input checked="" type="checkbox"/> Práce je literární rešerší ve smyslu zveřejněných požadavků (pravidel). <input type="checkbox"/> Práce obsahuje navíc i vlastní výsledky.	
<b>Cíle práce (předmět rešerše, pracovní hypotéza...)</b>  Předkládaná práce si klade za cíl shrnout dostupné informace o interakci velmi malých zlatých a křemíkových nanočástic s různými typy savčích buněk.	
Struktura (členění) práce: Práce má klasické a poměrně logické členění. Nechybí abstrakt ve slovenštině a angličtině, obsah, seznam zkratk, krátký úvod a samotný text rešerše s přehledným členěním do podkapitol (Definovanie nanočástic, Biomolekulární korona, Nanočástice v biologickom prostredí, Nanočástice, Vstup nanočástic do bunky, Zlaté nanočástice, Křemíkové nanočástice, Závěr). Tyto kapitoly jsou pak dále členěny.	
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů?  Autorka v práci cituje asi 115 literárních zdrojů, z toho jsou čtyři citace sekundární. Některé práce jsou citovány jen na jednom místě, kvůli podpoření jediného určitého tvrzení. S použitím relevantních údajů je to poněkud složitější. Práce obsahuje většinou velmi obecný popis výsledků, které jsou v literatuře dostupné. Nepochybuji o tom, že se autorka v tématu dobře orientuje, ale čtenář je nucen na mnoha místech dohledávat detailnější informace v citovaných článcích. Nikde v práci se nedozvídáme, jaké byly použité zvířecí modely. Přitom právě porovnání různých typů buněk bylo také cílem práce. Chybí popis (nebo jen výčet) povrchových molekul buněk, na které se nanočástice váží. Je to přitom zásadní pro pochopení mechanismu endocytózy. Jaké kontrétní proteiny jsou exprimovány při stresu vyvolaném nanočásticemi? Chybí mi tedy detailnější informace o tématu.	
Pokud práce obsahuje (nadstandardně) i vlastní výsledky, jsou tyto výsledky adekvátním způsobem získány, zhodnoceny a diskutovány?  Práce neobsahuje vlastní výsledky, autorka však naznačuje, čeho se bude týkat její práce diplomová.	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):  V práci je minimální množství překlepů. Použitý jazyk je dobře srozumitelný. Práce obsahuje jediný převzatý obrázek, který znázorňuje možné mechanismy	

vstupu nanočástic do savčí buňky. Přitom právě označení nanočástic v legendě chybí a patrně jsou zobrazeny dvojím způsobem. Místo popisu rozmístění nanočástic ve snímcích z elektronové mikroskopie (str. 13) by asi bylo vhodnější tuto obrazovou dokumentaci přímo převzít.

### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Autorka seznámila čtenáře se všemi možnými mechanismy, pomocí kterých nanočástice do buněk vstupují. Téma práce je v současné době hojně zkoumané a je proto velké množství - často protichůdných - informací v literatuře.

Chtěl bych autorce vytknout, že nás obecně seznamuje s parametry nanočástic důležitými pro jejich účinek, ale v popisu výsledků tyto parametry většinou nekomentuje, nebo vůbec neuvádí. O vlastnostech biomolekulární korony nanočástic (viz název práce) se pak v textu vlastně nedozvídáme nic konkrétního.

Postrádám jakési přehledné porovnání účinku velkých/malých nanočástic, rozdíly dle chemického složení, vliv povrchových modifikací, povrchového náboje, tvaru, atd. Vlastně se domnívám, že jednoznačné závěry z takového srovnání nejsou ani dost dobře možné. V literatuře se totiž často najde u nanočástic „určitého typu“ názor, že jsou výborně biokompatibilní a v jiné práci pak je zkoumán jejich výrazný cytotoxický účinek (typicky na jiné tkáňové linii).

Prosím autorku, aby se pokusila při obhajobě nějakým způsobem (třeba jen formou tabulky) shrnout dostupné (ač mnohdy protichůdné) údaje o cytotoxicitě, podpořené citacemi.

### **Otázky a připomínky oponenta:**

K práci mám větší množství dalších poznámek, které přikládám na závěr posudku.

Na několika místech práce jsem získal dojem, jako by se nanočástice snažily aktivně vstupovat do buněk. Tak tomu nepochybně není, protože Au/Si nanočástice neprošly žádnou evolucí, nebyly nijak selektovány. Pokud jsou do buněk nějak atrahovány, pak na základě fyzikálních jevů. (Podobně je to se snahou proteinů pokrýt co největší část povrchu nanočástice.) Případně mohou být aktivně dopravovány do buněk, pokud mají nanočástice na svém povrchu vázané molekuly, díky kterým si částici buňka „splete“ s jiným nákladem, jehož internalizace by pro ni jinak byla výhodná. Nebo má buňka nějaký zájem na pohlcení nanočástic?

#### **Otázky:**

- Jak se liší působení nanočástic oproti jednotlivým atomům nebo iontům Si a Au a jak oproti mikročásticím? Předpokládá se uvolňování jednotlivých atomů, nebo iontů z nanočástic do buňky? Jak by pak zlato působilo? Kam se v buňce váže?
- Jak jsou nejčastěji nanočástice do tkáňových kultur přidávány? Má způsob aplikace vliv na vstup do buněk?
- Předpokládáte cytotoxický efekt nanočástic pouze po internalizaci, nebo i při vazbě na povrchové struktury buněk? Jak by to bylo u bakterií, nebo rostlin?

- Po endocytóze je nanočástice v cytoplazmě obalena membránou. Jak (pokud vůbec) je tato membrána dále narušována?
- Dokážete uvést konkrétní podmínky, za kterých byl prokázán cytotoxický efekt AuNPs a SiNPs. A ze kterých okolností naopak částice vykazují vysokou biokompatibilitu?

### Doplňující otázky:

- „Biomolekulární korona určuje odpověď buněk na přítomnost nanočástice.“ Mají tedy NP různého složení se „stejnou“ biokoronou vůbec rozdílné vlastnosti během transportu? Jak by se chovala např. latexová částice?
- Jak si představujete narušení membrány pomocí Au NP? Je to dočasný jev, nebo trvalejší? Jak by narušovaly membrány např. malé kousky křemene nebo uhlíku?
- Jakou mají nanočástice „molekulovou hmotnost“ a jak rychle difundují v porovnání s běžnými molekulami?
- Jak se NP vlastně detekují? Jak se dokazuje, že se jedná opravdu o hledanou částici (daného chemického složení)?

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

## Připomínky (není třeba reagovat)

O jak velký celkový povrch nanočástic se jedná, pokud je zkoumána adsorpce proteinů do korony in vitro?

Vďaka unikátnym chemicko-fyzikálnym vlastnostiam, ktoré vo veľkej miere súvisia s ich rozmermi sú nanočastice schopné špecifickej interakcie so živým organizmom až na molekulárnej úrovni.

RF: O ktoré konkrétne vlastnosti se jedná?

Aj keď sú zlaté a kremíkové nanočastice jednými z najviac študovaných o interakcii ultramalých nanočasticiach zo zlata a kremíku na úrovni buniek a molekúl sa veľa nevie. Táto práca má za úlohu predstaviť dostupné informácie o interakcii ultramalých zlatých a kremíkových nanočastic s rôznymi typmi cicavčích buniek. Aj keď je takýchto prác len veľmi málo, hlavne čo sa kremíkových nanočastic týka, interakcia ultramalých nanočastic je unikátna.

Proteíny adsorbujú tak, aby bol povrch materiálu pokrytý čo najvyšším možným počtom ich molekúl. RF: proteíny se patrne nesnaží navázat co nejvíc svých molekul. Nejedná se o řízený děj, každá molekula se k povrchu váže samostatně.

... Súčasne sa môže znížiť aj kontaktná plocha na jednu molekulu aby bolo celkové množstvo adsorbovaného materiálu čo najväčšie RF: jako kdyby to byl ze strany proteinů zamýšlený aktivní proces

Z experimentálneho hľadiska je veľmi dôležité, že postupným obalovaným povrchu nanočastice molekulami prostredia dochádza k zväčšeniu polomeru nanočastice. RF: o kolik se zvětší průměr nař. 100 nm částice?

Biomolekulárna korona ... často ukrýva nanočasticu pred niektorými bunkami imunitného systému

RF: nejsou zde špatně sbalené proteiny, které by naopak měly být rozpoznány?

... a zásadne ovplyvňuje mieru cytotoxicity nanočastice

RF: jak by fyziologické proteiny měly vyvolávat cytotoxicitu?

Konečná štruktúra hard korony odráža evolúciu nanočastice. Vždy čiastočne obsahuje molekuly z pôvodného prostredia aj keď ostáva lokalizovaná v inom prostredí (Lundqvist et al. 2011). RF: neplatilo by to i pro jakékoli jiné povrchy in vitro?

Pri použití pre-coatingu je často pozorovaná kolokalizácia nanočastic so špecifickými molekulami v rámci bunkových kompartmentov alebo cytoplazmy bunky (Estrela-Lopis et al. 2011). RF: odpovídá to interakcím těchto proteinů bez vazby na NP?

Krv je pravdepodobne schopná modifikovať povrch každého cudzieho materiálu mnohými odlišnými mechanizmami, ale zároveň tak, aby boli tieto mechanizmy kompatibilné s jej zložením (Vroman et al. 1977). RF: co je to kompatibilita mechanizmu?

Niektoré apolipoproteíny v krvi asociujú s lipoproteínovými partikulami približne rovnakých rozmerov ako majú nanočastice na ktoré adsorbujú. To môže byť vysvetlením, prečo sú vo finálnej štruktúre biokorony aj napriek svojej nie príliš vysokej koncentrácii v krvi pomerne hojne zastúpené RF: jak to souvisí? proč by apolipoproteiny v lipoproteinových partikulách měly interagovat snáze s NP?

Jak "tvar a celková plocha adsorpčního povrchu" ovlivňuje složení korony?

Aby mohlo prísť k adsorbcií proteínu k povrchu, musí dosiahnuť určitej koncentrácie, pri ktorej sa stane povrchovo aktívnym. Niektoré proteíny krvnej plazmy dosahujú pomerne vysokej povrchovej aktivity pri ich fyziologických koncentráciách (albumín, IgG), iné sú pri fyziologickej koncentrácii len veľmi slabo povrchovo aktívne (krvný faktor FXII). RF: jak souvisí povrchová aktivita látek s jejich koncentrací? Platilo by to i pro menší molekuly? Surfaktanty?

...bolo pozorované, že do bunky vstupujú až po vytvorení malého zhluku partikulí ... RF: právě, že při nenulové koncentraci iontů spousta nanočástic agrague a mají pak nejružnější velikosti. Dá se tedy vůbec in vitro / in vivo o velikosti NP mluvit?

... V prípade, že nanočastice sú aj napriek tomu detekované v cytoplazme bunky, na procese internalizácie sa nepodieľa aktívny cytoskelet (alebo ho príslušná bunka vôbec nemá), NPs nie sú vôbec viazané k membráne a nie sú detekované žiadne cytosolické vaky s obsahom NPs, autori vyjadrujú predpoklad, že by sa tieto NPs mohli dostať do bunky špecifickými adhezívnymi interakciami, difúziou napr. cez póry. Je veľmi zaujímavé, že Geiser et al predpokladajú takýto mechanizmus vstupu do vnútra makrofágov a erytrocytov pre pomerne veľké AuNPs (25 nm) a TiO<sub>2</sub>NPs (100 nm, 200 nm). Ukázalo sa, že voľný vstup NPs do buniek dovoľuje časticiam pomerne voľný presun v rámci kompartmentov daného tkaniva, respektíve orgánu, ktoré sú dobre detekovateľné (Geiser et al. 2005).

RF: Přes jaké póry by měl difúze probíhat? Tento mechanismus se zdá být velmi nepravděpodobný.

In vivo štúdiami bolo dokázané, že dokážu prestupovať rôzne orgány a tkanivá, napríklad pečeň, pľúca, slezinu, krv, srdce, obličky, tenké črevo, mozog, kosti, svaly, pohlavné orgány, a interagovať s nimi na bunkovej úrovni (Morais et al. 2012).

RF: Srovnání prostupnosti krve a kostí zde není srozumitelné.

...Zlaté nanočastice samy o sebe nemusia byť toxické, ale v závislosti na metóde výroby môžu niektoré ich prekursorov spôsobovať pri vyšších koncentráciách cytotoxicitu (Connor et al. 2005).

RF: Stálo by za to specifikovat podstatné vlastnosti, které jsou za cytotoxicitu asi zodpovědné. Jedná se o chemické kontaminace?

...Po inkubácii zlatých nanočastíc s ľudskými hepatocytmi a ich internalizácii AuNPS ovplyvnili expresiu génov antioxidantných látok, proapoptických enzýmov a génov podieľajúcich sa prevažne na metabolizme fosfolipidov a liečiv.

RF: jedná sa tedy o srovnateľný typ stresu?

Bolo pozorované niekoľkonásobné zvýšenie produkcie reaktívnych foriem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS).

RF: Čím je to vyvoláno? Chemickými procesy na NPs alebo naopak aktívni obranou buňky? AuNPS (jak je zmíněno dále) vykazují antioxidantní účinky...

RF: Au se váže na některé chemické struktury např. na proteinech. Má takováto interakce vliv na pinocytózu NPs? Nebo jsou atomy Au zcela schovány pomocí korony?

Predpokladá sa, že aktívnym vstupom nanočastíc do bunky došlo k zvýšeniu stresu, ktorý mohol zapríčiniť zmenu objemu bunky...

RF: co je v tomto prípade aktivní vstup?

Alkalizácia lyzozómov je pravdepodobne spojená s disociáciou dôležitého štruktúrneho proteínu lyzozomálnej ATP-ázovej pumpy (Ma et al. 2011).

RF: jak AuNPs mohou vyvolávat disociaci ATPázy (od membrány)?

... (Chithrani et al. 2006). Táto práca uvádza rozmer nasyntetizovanej nanočastice a dokonca potvrdzuje vznik biokorony po styku s biologickým prostredím. Rozmer nanočastice v okamihu interakcie s bunkou v tomto prípade však nie je totožný s veľkosťou NP po jej výrobe. Ako sa spomína v prvej časti tejto práce, po vytvorení biomolekulárnej korony priemer nanočastice vzrastá, ale väčšina prác veľkosť nanočastice po styku s proteínmi neuvádza a často ani neskúma. Pri popise biologickej interakcie nanočastíc je to ale chýbajúci dôležitý údaj.

RF: autorka se zde chová podobně a neuvádí kontrétní údaje. Jak se tedy změni velikost NP po vazbě proteinů korony? Jak je taková změna velikosti detekovatelná?

... po použití špecifických blokátorov sodných, draselných a vápnikových iónových kanálov prišlo k poklesu AuNPs detekovaných v mozgu až takmer o 50%. Autori tejto štúdie preto predpokladajú, že použité AuNPs môžu penetrovať hematoencefalickú bariéru aj voľným prechodom cez tieto iónové kanály, ktorých priemer by prechod takto veľkej častice teoreticky dovoľoval.

RF: Ale zmíněné kanály jse velmi specifické pro konkrétní ionty. NP touto cestou do buňky patrně neprojde a to např. proto, že nemá (ve srovnání s jednotlivými ionty) nijak velkou molární koncentraci. Z kolika atomů se vlastně skládá AuNPs o velikosti 1,3 nm?

Bylo by možné porovnat Si a Au NP co do cytotoxicity, morf. změn, průchodnosti přes konkrétní membrány, ... ? Jsou výsledky s 16nm a 100nm SiNP porovnatelné? Byly obě použity ve stejné koncentraci? Nebo se shodným celkovým povrchem? Jak má čtenář chápat dvě sdělení v jednom odstavci na str. 21:

Nanočastice s malým priemerom (14 nm – 16 nm) spôsobovali nekrozu ...

... Všeobecne sú kremíkové nanočastice väčšie ako 50 nm považované za biokompatibilné, ak spôsobujú cytotoxicitu, tak len v minimálnej miere

RF: je v buňce nějaká struktura, která by právě rozdíl mezi 16 a 50nm jasně vysvětlovala?

RF: postrádám jakékoli konkrétní informace o povrchích zmiňovaných NPs. Jak vypadá terminace povrchových atomů? Jaký mají částice náboj? S jakými ionty interagují? Jaký vliv na to má např. pH? Jak tyto vlastnosti souvisí se schopností NPs přecházet přes fosfolipidové dvojvrstvy? Jaká síla by je měla přitahovat do nitra buněk?

RF: Nechápu: V prvom kroku, pri stanovení energetiky mechanismu, sa kvantitatívne porovnáva vstup nanočastíc do bunky pri inkubačnej teplote nanočastíc s bunkami 37 °C a 4 °C. Ak je proces vstupu do bunky energeticky závislý (endocytóza a pod.), počet internalizácií je výrazne vyšší pri inkubácii pri 37 °C a pri teplote 4 °C prebieha len minimálne alebo vôbec. Využitím pasívnych procesov je to presne naopak. Jak by se projevilo izotermální snížení hladiny ATP v buňkách?

... dá sa veľmi presne izolovať hlavný mechanizmus, ktorý bunky pri prijímaní nanočastíc využívajú (Herd et al. 2013).

RF: je to pro buňku nějak výhodné? Nebo snad naopak pro NP? Lepší snad bylo „mechanizmus, kterým k internalizaci dochází“

Co je to "exkréce LDH (laktát-dehydrogenáza)" a kdy k ní obvykle dochází? Jak si vysvětlit, že nejvíce ovlivňují buněčné funkce 12nm SiNPs, a méně 10 a 20nm? Jsou rozdíly v literatuře významné?

RF: Testoval někdo současnou administraci SiNP a AuNP? Bylo by tak možné pozorovat přesněji rozdíly v kinetice šíření a lokalizaci? Interagují tyto NPs mezi sebou?

Kremíkové nanočastice ovplyvnili aj ďalšie bunkové funkcie v závislosti na type bunky. U epitelových buniek bol ovplyvnený metabolizmus lipidov, štruktúra malých molekúl, molekulárny transport a signalizácia. Zmeny morfológie bunky, signalizácie a bunkových interakcií vyvolalili nanočastice u makrofágov (Breznan et al. 2017).

RF: práce je plná takto obecných sdělení...

RF: v závěru se píše: Ich unikátne charakteristiky, ako vyššia mobilita a väčšia schopnosť penetrácie vychádzajúce z chemicko-fyzikálnych vlastností sú často spájané s možnou cytotoxicitou.

RF: čím je tedy ovlivněna schopost penterace NP do buněk a tkání, a cytotoxicita?