

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

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Lucie Vrabcové s názvem „Interakce buněk s nanomateriály a jejich využití v biomedicině“

Mgr. Lucie Vrabcová předložila k oponentuře disertační práci, která se zabývá problematikou interakce různých nanomateriálů s biologickým rozhraním. Disertační práce má celkem 160 stran a je členěna na 12 kapitol zahrnujících popis současného stavu vědy v dané oblasti, metodiky i výsledky vlastní práce, které jsou ve výsledcích uvedeny jak ve formě komentovaných článků, tak i ve formě dosud nepublikovaných dat. Články s daty, které již byly publikované, jsou na konci práce uvedeny v plném znění. Součástí práce je podrobná diskuse, závěry a seznam citované literatury s více než 200 odkazy. Práce je psaná v odborném anglickém jazyce, ke kterému nemám až na drobnosti výhrady. Autorka se důsledně odkazuje na použitou literaturu.

Po obecném úvodu je vlastní práce dělena do čtyř větších projektů (ještě dále dělených na podcelky), na kterých autorka pracovala. Konkrétně se jedná o:

- 1) porovnání povrchových modifikací UFG titanu vzhledem k adhezi a proliferaci osteoblastů, fibroblastů, keratinocytů a mezenchymálních kmenových buněk;
- 2) porovnání odpovědi osteoblastů na interakci a internalizaci různých křemíkových nanočástic;
- 3) vyvinutí metodik pro mikroskopické sledování křemíkových nanočástic pomocí jejich fluorescence při internalizaci do buněk v reálném čase; a
- 4) porovnání toxicity zlatých a platinových nanočástic pro osteoblasty v závislosti na koncentraci nanočástic.

Dle těchto dílčích projektů jsou děleny jak metodiky a výsledky, tak i diskuze a závěry. Toto dělení ubírá práci na přehlednosti a čtenář musí neustále hledat, který experiment, metodika a článek patří dohromady. Autorka sice všechny podcelky označila různými písmeny, ale dle mého názoru to není ideální. Je pochopitelné, že když je práce složena z několika projektů, je poměrně náročné sepsat souvislý text. Nicméně by bylo pro čtenáře jednodušší, kdyby každý projekt měl svoji kapitolu s krátkým specifickým úvodem, metodikou, výsledky, diskuzí a publikované výsledky by měly uvedeny příslušnou

citaci.

Aktuálnost zvoleného tématu

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

Cíle disertační práce, zvolené metody a výsledky

Práce je velmi široce zaměřena, cíle jsou poměrně různorodé. Je to dané charakterem práce - kompilací několika témat a testováním poměrně bohaté škály materiálů, a to jak v podobě strukturovaného povrchu, tak i v podobě nanočástic. Práce sice při čtení metod a výsledků nepůsobí kompaktně, jak jsem již uvedla výše, ale vše nakonec vhodně propojuje diskuse. Osobně mi na začátku práce chybí definování experimentální linie, která by propojila jednotlivé projekty. Také bych před popisem každého projektu uvítala definici dílčích hypotéz a k čemu může tento specifický výzkum sloužit. Cíle práce jsou čtyři a jsou všeobecně uvedeny v seznamu na straně 38, dále jsou trochu rozvedeny na začátku popisu výsledků. Metodiky jsou poměrně početné a dobře zvolené. V práci jsou detailně uvedeny postupy, které nejsou zahrnuty v publikovaných sděleních. Zbytek metodik je potřeba dohledat v příložených publikacích. Výsledky jsou popsány, diskutovány a povětšinou publikovány v recenzovaných časopisech.

Komentář

Na práci oceňuji snahu o propojení biologických sledování s fyzikálně chemickou charakterizací materiálu. Dle mého názoru je mezioborový výzkum v oblasti nanomateriálů naprosto zásadní. Dále na práci oceňuji testování širokého spektra materiálů a podobných biologických parametrů. V projektu titanového pokrytí se mi líbí poměrně komplexní panel buněčných linií a primární kultury PBMC – autorka tak pokryla většinu buněčných typů, se kterými by případný implantát interagoval. Velmi pěkně se četla diskuse, která dovysvětlila moje případné negativní připomínky.

Na práci se mi úplně nelíbilo členění projektů/metodik/výsledků dle písmenek a absence spojovací experimentální linie, jak jsem již uvedla dříve. U grafů B1-3, B5-7, E1 není jasné, co přesně znamenají kombinace indexů A, B, a, b, ab ... vzhledem ke statistice (k čemu se daný vzorek porovnával). V legendě je pouze uvedeno, co znamená velké a malé písmeno.

Splnění podmínek samostatné tvůrčí vědecké práce

Předložená disertační práce je kompilací 4 článků a dosud nepublikovaných dat a jako celek splňuje podmínky samostatné tvůrčí vědecké práce. Předložené výsledky byly publikovány ve čtyřech impaktovaných časopisech. Dvě z těchto prací jsou práce prvoautorské.

Závěr

Na základě posouzení předložené práce z hlediska její vědecké úrovně, přístupu řešení a výsledků, konstatuji, že **práce splňuje požadavky kladené na disertační práci**. Nedostatky uvedené v posudku nesnižují celkovou kvalitu disertace. Z výše uvedených důvodů vřele **doporučuji disertační práci Mgr. Vrabcové k obhajobě**.

Otázky:

1. V práci používáte intracelulární značení (aktinu, vezikul) u buněk fixovaných 4% paraformaldehydem. Není zmíněna následná permeabilizace například jemným detergentem. Používali jste nějaký speciální například promývací roztok, který by detergent obsahoval?
2. Proč jste ke stanovení imunogenních účinků nanočástic vybrali pouze cytokiny TNF- α a interleukin-8?
3. U SiQD 1100 a 1050 byl zjištěn pouze rozdíl velikosti o 1nm a rozdílné maximum emise? Mohla různá teplota při přípravě částic ovlivnit osazení povrchu například různým množstvím reaktivních skupin? Nebo jak jinak vysvětlujete rozdílný vliv těchto částic na metabolickou aktivitu SAOS-2 buněk.
4. Na straně 76 jste u SAOS-2 buněk prokázali možnou kolokalizaci SiQD s endozómy a posléze lysozómy. Znamená to, že SiQD jsou z buňky posléze transportovány ven? Jaký podíl SiQD zůstane v buňce (pokud nějaké)? Jak rychle se buňka zbaví všech SiQD? K čemu by se tyto SiQD daly použít v praxi (když buňku posléze opustí)? Kde jsou ty SiQD, které nekolokalizovaly s endozomálním nebo lysozomálním markerem?

V Praze, 5. června 2019