

Bc. Tereza Bělinová zpracovala magisterskou práci zaměřenou na sledování vlivu křemíkových nanočástic na lidské osteoblasty a monocytární buněčnou linii.

Formální kvalita předloženého textu:

Práce je přehledně a precizně členěna, vhodně doplněna obrázky a kvalitně zpracovanými grafy.

Jazyk:

Gramaticky a formulačně je práce bezchybná.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu:

Práce se zabývá popisem chování tří typů křemíkových částic při interakci s osteoblasty a monocytární buněčnou linií. K charakterizaci působení na buňky autorka použila širokou škálu metod, které podrobně popisuje. V práci ukazuje, že každý typ částic při interakci s buňkami může odlišně ovlivnit např. životaschopnost buněk, právě v závislosti na typu použité buněčné linie. Dále se práce zabývá vlivem sérových proteinů na chování nanočástic a výsledně na efekt v interakci s buňkami.

Práce je metodicky bohatá a výsledky jsou široce komentovány, včetně i takových výsledků, které nepřinesly očekávaný výstup.

Slabým bodem, přes veškerou preciznost s kterou byla práce tvořena, je mizivá charakterizace nanočástic, které jsou v práci použity. Přestože je práce biologicky zaměřena, pohybuje se na mezioborové linii a informace o syntéze a charakterizaci částic jsou pro hodnocení změn v buňkách často zásadní. Dalším slabým bodem je chybějící úvaha nad cílem práce resp. k jakému účelu tyto částice mohou být použity, a tím také myšlenkový podklad testování interakce těchto částic na vybraných buněčných liniích.

Hodnocení části předkládaného textu:

1. Literární přehled

Literární přehled je dobře strukturován, pokrývá rozsahem témata, která se dotýkají zkoumaných nanočástic a jejich interakce s buňkami. Přehled je doplněn několika obrázky.

2. Materiál a metody

Autorka použila řadu metod, které velmi detailně popsala a rozpracovala. Doporučila bych při přípravě dalších textů vkládat přímo do daných kapitol metodické části počty replikátů a opakování. Přestože, tyto informace autorka uvádí v experimentální části a na konci metodické části, je těžké se v nich orientovat.

3. Výsledky

Autorka prezentuje výsledky s využitím 15 grafů a 16 obrázků. Zejména se jedná o popsání kultivačních podmínek vybraných buněčných linií, jejich viability, charakterizace formou průtokové cytometrie a mikroskopie. Výsledky jsou velmi přehledně a systematicky uvedeny. Komentáře k prováděným experimentům jsou podrobné a zahrnují zamyšlení nad pozitivními i negativními výstupy. Tento fakt je významný zejména s ohledem na problematické chování nanočástic, které nebylo možné predikovat. K charakterizaci interakce nanočástic s buňkami a chování samotných buněk se vztahuje několik komentářů a dotazů, které jsou uvedeny níže v připomínkách a otázkách.

4. Diskuze a závěr

V diskuzi autorka shrnuje dosažené výsledky a kriticky se nad nimi zamýšlí. Do budoucna bych doporučila doplnit diskuzi výsledků o porovnání či vztahování do kontextu s obdobnými již publikovanými daty.

Dle názoru oponenta je práce velmi dobře napsána, data jsou jasně a srozumitelně prezentována. Tereza Bělinová prokázala schopnost získávat experimentální data, analyzovat je a umístit je do kontextu tématu aplikace nanomateriálů.

Připomínky k práci a otázky do diskuse:

Jak již bylo naznačeno v úvodu posudku, práci by výrazně přispěl popis cíle použití a testování částic, a také vysvětlení výběru daných buněčných linií.

Dále je zde zásadní mezerou mizivý popis použitých nanočástic. Jednotlivé částice a v případě více šarží i u nich, je vždy nezbytné, uvádět alespoň odkaz na jejich bližší charakterizaci. Pokud tato informace není k dispozici, je nutné částice popsat. Chybí zde bližší zobrazení rozložení velikostí formou grafu např. Dále není jasné jejich přesné složení (např. - jaký obsah boru či fosforu mají částice SiQDs ?; a v jaké formě?). Tudíž např. zda-li je přítomen na jejich povrchu náboj, nebo tomu tak není. Toto může zásadně ovlivnit viabilitu buněk.

Není zřejmé jakým způsobem dochází k odlišné přirozené fluorescenci jak popisuje autorka, pokud jsou částice velmi podobné? Tuto informaci by bylo vhodné doplnit.

Částice SiNP byly uchovávány ve třech typech roztoků. Jedním z nich byl roztok glycinu. Prosím o zdůvodnění uchovávání v tomto roztoku, a také koncentraci glycinu.

Autorka v úvodu popisuje exocytózu, nezamýšlí se nad autofagií. Právě autofagosomy v řadě případů hrají zásadní roli při eliminaci nanočástic z buňky. Prosím o zamýšlení nad rolí autofagie ve vztahu k použitým částicím.

Diferenční studie s THP-1 buňkami nebyly jednoznačné, což je s ohledem na buněčnou linii možné. Proč nebyla zvolena jiná buněčná linie např. RAW 264.7, případně jiná obdobná b. linie.

THP-1 byly stimulovány 100nM PMA. PMA vede také k oxidativnímu vzplanutí makrofágů. Prosím autorku o zamýšlení, zdali vedle směřování k diferenciaci by dle jejího názoru mohla stimulace PMA zásadně ovlivnit interakci nanočástic s buňkami a to jak jejich viabilitu tak např. exocytózu částic.

Autorka při charakterizaci viability buněk po inkubaci s jednotlivými částicemi většinou volila stanovení po 6, 24 nebo 48 hodinách inkubace. V některých případech však použila jiné časy – 2h a 24 hodin, nebo jen 48 hodin. Je možné vysvětlit, jakým způsobem autorka vybírala jednotlivé časové úseky pro jednotlivé experimenty?

Prosím o vysvětlení, proč k detekci apoptózy případně nekrózy nebyly použity jiné metody, např. detekce Caspas 3/7 pomocí WB nebo mikroskopie či průtokové cytometrie.

Oponentský posudek na magisterskou práci

Tereza Bělinová (2017) **Sledování vlivu křemíkových nanočástic na lidské buňky**

Prezentace mikroskopických dat např. kolokalizace s endosomy je bohužel špatně viditelná
V obrázcích, kde bylo možné vidět překrytí signálu částic a příslušné protilátky, je také přítomno viditelné světlo a bohužel není možné si prohlédnout faktický překryv.

Prosím o bližší informaci, proč autorka volila u různých částic rozdílné délky inkubace, např. obr. 14 uvádí SAOS-2 buňky inkubované s SiCs částicemi po dobu 4 hodiny v koncentraci 100ug/ml. Obr. 15 pak uvádí SAOS-2 buňky inkubované s SiNPs částicemi po dobu 48 hodin v koncentraci 100ug/ml