

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. Terezy Bělinové s názvem „Studium interakce buněk s nanočásticemi s využitím v biomedicině“

Mgr. Tereza Bělinová předložila k oponentuře disertační práci, která se zabývá odpovědí lidských buněk na expozici nanočásticím a to zejména z hlediska role proteinové korony. Disertační práce má celkem 74 stran a 5 vědeckých publikací vztahující se k tématu disertace, na kterých se autorka podílela. Text je rozdělen do 11 kapitol, které zahrnují společný úvod, cíle práce, metodiky, popisy publikovaných i nepublikovaných výsledků, diskuse k dílčím cílům, závěry a přehled literatury. Práce je psána v odborné angličtině a působí kompaktním dojmem. Obrázky jsou graficky povedené a dobře zapadají do textu. Autorka používá správnou terminologii a důsledně se odkazuje na použitou literaturu.

Společný úvod poskytuje srozumitelné informace o fyzikálně-chemických vlastnostech nanočástic, o možnostech interakce nanočástic s biologickými objekty a následných změnách v chování buněk. Metodiky, které jsou popsány u publikovaných výsledků jsou krátce shrnuty a metodiky použité k získání dosud nepublikovaných dat jsou rozepsány detailně. Oceňuji rozdělení kapitol výsledky, diskuse a závěr na podkapitoly dle jednotlivých cílů. Text je díky tomu přehledný a jednotlivé podkapitoly ucelené. V rámci výsledků autorka jasně označila a krátce shrnula dosažené výsledky, které již byly publikované a výsledky zatím nepublikované. Diskuse se orientuje zvláště na nepublikovaná data a zároveň dává vysvětlení a širší pohled na případné otázky ohledně některých (nečekaných) výsledků. Závěry k jednotlivým cílům práce jsou jasně a stručně formulovány.

Po stránce kvality vlastního textu lze mít k práci minimální výhrady spočívající v občasných nepřesnostech nebo překlepech (např. str.12 ... PC corona... =protein corona corona nebo str. 13 ... natural cancer immunity... =natural killer cell / anticancer immunity?).

Aktuálnost zvoleného tématu

Předložená práce odráží současný trend výzkumu. Nanočástice jsou v současné době atraktivním materiálem s vysokým potenciálem pro léčebné a diagnostické využití. Nicméně s extenzivním výzkumem jejich biomedicínského využití se často naráží na nepředvídané odpovědi biologického systému (případně toxicitu) a to zvláště po aplikacích nanočástic *in vivo*. Detailní studium (v podmínkách *in vitro*) potenciálně využitelných nanočástic vzhledem k interakcím s buňkami je aktuální, aby se vyloučily nevhodné typy nebo úpravy nanočástic.

Cíle disertační práce, zvolené metody a výsledky

Cíle disertační práce jsou čtyři – děleny dle zkoumaných nanočástic (Si-QD, Si-C, Au a DND). Jednotlivé cíle jsou stručně a jasně formulovány. Předložená práce pokrývá interdisciplinární téma čímž je dáno i velké množství různých metod. Každá metodika je komentována vzhledem ke svému

použití a vede k získání dílčích výsledků. Autorka také objasňuje případné problémy v metodice, kdy nemohla být generována data (např. Cryo-TOF-SIMS FIB SEM). Výsledky jsou dobře popsány a diskutovány. Závěry práce naplňují její vytyčené cíle. K práci nemám zásadní výhrady.

Komentář:

V abstraktu (cíle práce) jsou zmíněny pouze Si a Au nanočástice, ale práce pojednává i o ND částicích. Na straně 27, řádek 6 je uvedeno, že SiQD 1100 byly toxické a SiQD 1050 ne. Chybí mi vysvětlení (diskuze), proč byly tak odlišné (vedle toxicity i rozdílná agregace) – velikostně se lišily pouze o 1nm. Vzhledem k tomu, že závěr uvádí: Si QD jsou méně toxické než klasické QD, tak by bylo vhodné ukázat, jak vypadá daná analýza u klasických QD (zahrnout takový vzorek v rámci kontroly experimentu).

Strana 35. Je otázkou, do jaké míry lze usuzovat na imunomodulační efekt u permanentní linie v monokultuře. Situace bude pravděpodobně velmi odlišná při použití kokultur nebo např. PBMC, kde budou přítomné buněčné typy vzájemně komunikovat a regulovat tvorbu případných cytokinů. Pro další hodnocení imunomodulační vlastnosti nanočástic by bylo vhodné uvažovat využití více komplexního modelu.

Splnění podmínek samostatné tvůrčí vědecké práce

Předložená disertační práce vykazuje všechny znaky pro splnění podmínek samostatné tvůrčí vědecké práce a obsahuje původní výsledky. Tyto výsledky byly publikovány v pěti impaktovaných časopisech a dvě práce jsou 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 doporučuji disertační práci Mgr. Terezy Bělinové k obhajobě.

Otázky:

1. V práci jsou používány čtyři typy nanočástic (a různé přístupy charakterizace). Podle čeho byly nanočástice vybírány a proč se práce nezaměřila detailně na jeden vybraný typ nanočástic? Lze vyvodit nějaký společný závěr platný pro všechny testované nanočástice (z hlediska jejich efektu po internalizaci do buňky)?
2. *In vitro* testy jsou prvním krokem v charakterizaci nanočástic, ale výsledný efekt často jiný od situace v *in vivo* podmínkách a praktická aplikace nanočástic není možná. Budou nadějně částice dále studovány?
3. Str.34 odstavec 2 – zde je uvedeno, že SiC-NH₂ a SiC-x vedly ke stejnému snížení membrán.potenciálu, ale ve výsledku k opačnému efektu vzhledem k metabol.aktivitě mitochondrií (inhibice vs. aktivace). Na straně 52/53 je toto pozorování vysvětleno tím, že metabol.test detekuje i jiné buněčné dehydrogenázy. Toto ale stále nevysvětluje, proč je mezi SiC-NH₂ a SiC-x vzorky takový rozdíl? Lze to nějak vysvětlit na základě literatury/dat/zkušeností?
4. Na obrázku 13 strana 43 jsou zobrazeny frakce vzorku v jednotlivých odmývacích krocích. Kdyby se jednalo o větší nanočástice, předpokládala bych, že došlo k odmytí „soft“ proteinové korony a proteiny, které detekují jsou ty, které tvoří „hard“ koronu. Nicméně

nanočástice zde použité jsou USNP, u kterých se korony neodlišují. Jaké proteiny zde tedy detekuji po konečném odmytí – ty které jsou NP nejbližší?/mají nejsilnější interakci s NP? Existuje hypotéza, jaké proteiny a v jaké míře odmývám a kdy s odmýváním skončit? Po ustavení prvotní rovnováhy a vytvoření prvotní korony – zůstává tento stav/obal stabilní nebo dochází k jeho vývoji/stárnutí – při pobytu v médiu před internalizací buňkou?

V Praze, 11. listopadu 2020

Veronika Benson