



## OPONENTSKÝ POSUDEK DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

**Název práce:** Titanium dioxide-based materials for isolation and purification of clinically significant RNAs

**Autor práce:** Mgr. Denisa Smělá

**Vedoucí práce:** Prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

**Autor posudku:** Doc. Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

Předložená disertační práce se zabývá studiem využití různých typů nanomateriálů na bázi oxidu titaničitého (nanotrubice, nanotrubice modifikované nanočásticemi oxidu železitého a komerční sférické mikročástice lišící se velikostmi) pro izolaci a purifikaci různých typů RNA z rozličných biologických matric (tkáňové kultury, prekoncentrované viriony z nosních stěrů). V práci je také prezentována komparativní studie cytotoxicity vybraných nanovlákných materiálů.

### **Aktuálnost tématu**

Práce směřuje do oblasti přípravy analytu pro rychlou a citlivou molekulární diagnostiku. Nedávná pandemie SARS-CoV-2, která negativně zasáhla celou planetu, měla jednoznačný stimulační efekt na výzkum a vývoj nejen v oblasti diagnostiky. Vývoj nových levných a efektivních metod pro univerzální zpracování biologického materiálu pro vlastní, nejen virovou, diagnostiku je tak beze sporu velmi aktuálním tématem přínosným pro obor.

### **Vlastní práce**

Disertační práce je sepsána v anglickém jazyce a je koncipována jako souhrnný spis výsledků a diskuse komentující data, která již buď byla publikovaná (dvě impaktované publikace) nebo jsou součástí manuskriptů, jenž teprve budou odeslány do

recenzního řízení (dvě publikace). Předložená práce je sepsána na 158 stranách včetně příloh, obsahuje 59 obrázků a má členění obvyklé pro tento typ závěrečné práce.

V kapitole Úvod (*Introduction*) popisuje autorka historii objevu nukleových kyselin a následně o několik dekad později i rozluštění struktury DNA a vliv tohoto zásadního objevu na další rozvoj molekulární biologie. Stejně tak je čtivě popsána historie objevu různých typů RNA a následný rozvoj metod pro analýzu nukleových kyselin.

Kapitola Literární přehled (*State of the art*) se věnuje ve čtyřech kapitolách detailnímu popisu nekódujících RNA, virovým RNA, metodám pro izolaci a detekci RNA a možnostmi využití mikro- a nanomateriálů pro izolaci a analýzu RNA. Kapitola Literárního přehledu lze považovat za velmi zdařilou a erudovanou část textu, který se opírá výhradně o zahraniční zdroje, přičemž lze dodat, že značný počet literárních zdrojů svědčí o svědomitém přístupu autorky ke psaní práce.

### **Metodická část**

V metodické části práce (*Materials and Methods*) jsou na deseti stranách textu přehledně sumarizovány veškeré metodické přístupy využité pro získávání dat sloužících jako podklad disertační práce. Použité metody jsou plně relevantní k dosažení definovaných cílů.

### **Výsledky a diskuse**

Kapitola Výsledky a diskuse (*Results and Discussion*) je rozdělená na 3 podkapitoly, přičemž první z nich se zabývá daty z analýzy miRNA před a po fyzické námaze a výsledky z afinity materiálů na bázi oxidu titaničitého k RNA včetně samotné izolace RNA z tkáňových kultur. Druhá podkapitola se pak detailně zabývá návrhem a aplikací materiálů pro protilátkovou izolaci SARS-CoV-2 s následnou extrakcí RNA pomocí nanomateriálů na bázi oxidu titaničitého. Ve své finální části se podkapitola věnuje integraci těchto kroků do jednotného mikrofluidního zařízení. Třetí podkapitola je pak věnována cytotoxicitě různých typů nanovláčkových materiálů nanotrubic na bázi oxidu titaničitého a křemičitého a sférických nanočástic na

bázi oxidu titaničitého s různou krystalinitou. Celkově lze říct, že tato kapitola je velmi zdařile a čtivě sepsaná a prezentuje celou řadu zajímavých a unikátních výsledků přínosných pro obor.

### **Závěr a význam výsledků pro praxi a rozvoj vědy**

V Závěru a výhledu do budoucnosti (*Conclusions and perspectives*) autorka sumarizuje získaná data. Oponent by nicméně preferoval, kdyby se v této kapitole autorce podařilo práci lépe začlenit do aktuálního kontextu a využít kapitolu mnohem více pro sumarizaci perspektivy vlastní práce a očekávaného vývoje v této oblasti.

I přes tento drobný nedostatek je ale zjevné, že práce vygenerovala výsledky zajímavé nejen pro rozvoj vědy jako takové, ale také pro možný transfer do diagnostické praxe.

### **Připomínky a dotazy**

- 1) Oceňuji, že práce obsahuje jen velmi malé množství překlepů a typografických chyb (**In from of podosomes** v **Tab. 7**, geny nepsané kurzívou např. **RdRp** místo **RdRp**, etc.).
- 2) V seznamu referencí není unifikováno použití zkratk žurnálu (např. *Journal of Chromatography A* vs. *Anal. Methods*, atd.). Připomínky v bodě 1) a 2) ale nikterak negativně neovlivňují čtivost práce a její kvalitu.
- 3) V práci správně konstatujete, že celá řada reagentů pro analýzu cytotoxicity může být nanomateriály aktivována, díky čemuž může být maskována cytotoxicita a buňky se mohou tvářit jako metabolicky aktivní. Lze takový efekt očekávat i u aktivovatelných sond pro identifikaci ROS (např. v práci použité H<sub>2</sub>DCFDA)? Nezkoušeli jste inkubovat nanočástice s próbou v cell-free podmínkách?
- 4) Je možné sumarizovat reálné náklady na izolaci RNA pomocí komerčních metod a porovnat je s náklady na TiO<sub>2</sub>-zprostředkovanou izolaci RNA?
- 5) Čím si vysvětlujete markantně zvýšenou imunogenicitu in vitro S-SiO<sub>2</sub> nanovláken v porovnání s L-SiO<sub>2</sub> nanovláken (**Obr. 56**)?



- 6) Jak si vysvětlujete inverzní závislost mezi koncentrací L-SiO<sub>2</sub> nanovláken a produkcí ROS (Obr. 55)?
- 6) Jaký je dle Vás předpokládaný model interakce mezi nanovláknou a buňkou (kdy dle SEM na **Obr. 53C** jsou i po 60 s pozorovatelné fragmenty výrazně přesahující velikost buňky)?
- 7) Na **str. 130** zmiňujete, že získané výsledky indikují, že SiO<sub>2</sub> nanovlákná mají značný potenciál pro klinické aplikace. Můžete prosím zmínit oblasti a aplikace, ve kterých by mohla být nanovlákná využita?

Závěrem je mi potěšením konstatovat, že doktorská disertační práce Mgr. Denisy Smělé s názvem „*Titanium dioxide-based materials for isolation and purification of clinically significant RNAs*“ splnila definované cíle a celkově lze disertační práci hodnotit jako vědecké dílo, které je z formálního i věcného hlediska pečlivě zpracováno na vysoké vědecké úrovni.

Na základě celkového hodnocení disertační práce **mohu doporučit přijmout ji k obhajobě** a po její úspěšné obhajobě navrhuji udělit autorce titul „*philosophiae doctor*“ Ph.D.

V Brně dne 13. 5. 2023

