

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Student:	Mgr. Jan Čapek
Název práce:	Fluorescenční metody pro detekci buněčného poškození
Posudek zpracoval:	doc. Ing. Miloš Hroch, Ph.D.

Tématem práce předložené Mgr. Janem Čapkem je optimalizace spektrofluorimetrických metod pro zjišťování intracelulární koncentrace glutathionu, optimalizace metody pro detekci fragmentované DNA a studium toxického poškození buněk kadmíem.

Disertační práce je členěna obvyklým způsobem a má celkem 132 stran, z čehož 58 stran je věnováno teoretickému úvodu. Teoretická část je zpracována pečlivě a autor se zde věnuje popisu fyzikálního jevu fluorescence, konceptu buněčného dýchání s popisem jednotlivých komplexů dýchacího řetězce a popisu fluorescenčních sond, které jsou využívány při hodnocení membránového potenciálu mitochondriální membrány, koncentrace reaktivních forem kyslíku a dusíku a při vizualizaci DNA. Zvláštní pozornost je věnována glutathionu, jeho funkci, syntéze a jeho detekci.

V druhé části disertační práce pak nalezneme popis cílů, experimentální část, výsledky, diskuzi a závěr. Součástí jsou i tři publikace v časopisech s impaktním faktorem. Jedna, kde je předkladatel prvním autorem a dvě spoluautorské. Text práce je doplněn množstvím citací, kterých je 267. Po formální stránce práce obsahuje minimum překlepů, i když v některých částech se autor nevyhnul poněkud krkolomným, nebo neobvyklým formulacím. Celkově lze konstatovat, že práce je přehledně zpracovaná. Připomínky a dotazy k textu jsou shrnuty níže.

Majoritní připomínky

- Moje zásadní připomínka se týká cílů práce. V případě disertační práce bych očekával vývoj nových postupů či metod. Dva body ze třech uvedených se zde zabývají optimalizací metod. Optimalizace bývají náplní spíše diplomových prací. Mohl byste více přiblížit unikátnost vámi získaných výstupů?
- V kapitole *Cíle práce* bych očekával alespoň stručné zdůvodnění, proč se problematice věnujete.

Minoritní připomínky

Str. 12) V seznamu zkratk chybí zkratka FCCP.

Str. 16) V kapitole 2.1.1 je popisován vztah mezi energií, vlnovou délkou a frekvencí záření. V textu je uveden matematický vztah mezi vlnovou délkou a frekvencí. Vzhledem k tématu diskutovanému v tomto odstavci by bylo vhodné pro úplnost uvést i vztah mezi frekvencí a energií záření.

Str. 17) Pro označení σ orbitalů je chybně použito řecké písmeno δ .

Str. 22) U obrázku 6 chybí v popisku uvedení zkratky UCP - Uncoupling protein. Zkratka není uvedena ani v seznamu zkratk na začátku disertační práce.

Str. 23) Na obrázku 7 je špatný vzorec ubichinolu. V rovnici je na obou stranách uveden ubichinon.

Str. 25) Obrázky 8 a 15 jsou velmi špatné kvality, problematicky čitelné. Bylo by žádoucí vložit do práce jako errata obrázky v lepší kvalitě.

Str. 43) Uniká mi význam věty: „Mezi exogenní inductory ROS řadíme poluce ve vodě či vzduchu“.

Str. 45) Uniká mi význam věty: „Velice důležitý fakt, kdy dojde k prostupu MitoSox z mitochondrií do cytoplasmy, kde je vyšší nabídka nukleových kyselin, dochází ke zvýšení fluorescence“. Tato věta opravdu není česky!

Str. 48) Termín homovanilická kyselina není v češtině používán, má být uvedeno kyselina homovanilová.

Str. 76) Hodnota koeficientu determinace - R^2 v intervalu 0-50 min by měla být uvedena se stejným počtem desetinných míst jako u zbytku výsledků.

Dotazy

1. Str. 36) Formulace „*inertnost molekulárního kyslíku ...*“ může být pro nezasvěceného čtenáře zavádějící a nepovažuji ji za šťastnou. V jakém ohledu je kyslík podle vás inertní?
2. Str. 73) Jakým způsobem byla hodnocena linearita závislosti čas vs. fluorescence v prvních minutách po přidání činidla?
3. Pokud se zaměříme na *in vivo* buněčné modely, kde jsou fluorescenční sondy používány např. k hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu, byl u nich studován vliv na normální funkci mitochondrií? Přece jen přidáváme do živého systému něco, co tam nepatří.
4. Proč nebyly u MCB testovány vyšší koncentrace než 40 μM ?
5. Při optimalizaci byl využit přístup „one-factor-at-the-time“, nezvažovali jste multifaktoriální optimalizace s využitím statistických metod (Plackett-Burman)?
6. OPA je činidlo běžně používané k derivatizaci primárních a sekundárních aminů při jejich fluorescenčním stanovení. Dovedl byste popsat, v čem spočívá u některých látek největší slabina při využití této konkrétní derivatizace.
7. Str. 43) V kapitole 2.4.1.3 zmiňujete pití alkoholu jako jeden z faktorů zvyšujících oxidační stres. Dovedl byste popsat některý z mechanismů, kterým dochází k nárůstu oxidačního stresu v tomto případě.

Závěr

Disertační práce obsahově odpovídá schválenému tématu a student naplnil vytýčené cíle. Využité metody a postupy byly adekvátní. Výsledky práce studenta byly otištěny ve třech impaktovaných časopisech s nezávislým recenzním řízením. Doktorand tedy prokázal dostatečnou schopnost samostatného řešení vědeckých úkolů a jejich prezentace. Jako jediný problém vnímám málo zdůvodněné cíle práce. Student by měl v rámci obhajoby dostatečně vyzdvihnout a zdůraznit přínos jeho optimalizačních experimentů. Po zvážení všech dostupných faktů **doporučuji práci Mgr. Jana Čapka přijmout k obhajobě.**

V Hradci Králové dne 25.5. 2020

doc. Ing. Miloš Hroch, Ph.D.