



Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav lékařské biologie a genetiky

OPONENTSKÝ POSUDEK K DISERTAČNÍ PRÁCI

- Autor práce:** Mgr. Pavlína Majtnerová, Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická Katedra biologických a
biochemických věd
- Téma práce:** Vývoj spektrofluorimetrické metody pro detekci nukleární
kondenzace a fragmentace v buňkách (Development of a
spectrofluorimetric method for detection of nuclear
condensation and fragmentation in cells)
- Školitel:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Obecné poznámky:

Posuzovaná dizertační práce Mgr. Pavlíny Majtnerové je sepsána v českém jazyce, má standardní členění, celkem 132 stran včetně 19 příloh zahrnujících kromě originálních experimentálních dat i 2 autorkou publikované články (1x experimentální práce a 1 x souhrn – obě v časopisech s IF).

Kromě toho je dokladováno spoluautorství předkladatelky v dalších třech experimentálních pracích (2 x časopisy s IF a 1 x časopis s neurčeným IF), jejichž obsah volně souvisí s předkládanou dizertační prací.

Souhrn posudku:

Ve své dizertační práci se její předkladatelka Mgr. Pavlína Majtnerová věnovala vývoji a validaci nového metodického přístupu pro základní hodnocení přítomnosti a kvantifikace buněčné smrti – apoptózy u experimentálních *in vitro* modelů (vybraných adherentních stabilizovaných buněčných linií). Deklarované výsledky práce naznačují, že stanovený experimentální cíl byl naplněn. Prezentovaná spektrofluorimetrická detekce nukleární kondenzace a fragmentace u apoptických buněk pomocí fluorochromu Hoechst 33258 poskytla v uvedených testovaných modelech srovnatelné výsledky s referenční metodou TUNEL a může poskytovat i další potenciální výhody jakými jsou např. rychlost stanovení, možnost simultánní analýzy větších počtů vzorků (tzv. optimalizovaný workflow) včetně příznivých finančních nákladů na vlastní stanovení.

Z experimentálního hlediska je třeba vyzdvihnout, že předkladatelka využila a zvládla spektrum technik a metodických postupů, které jsou rutinně používány v cytologických a molekulárně biologických laboratořích, a to včetně práce s živým biologickým materiálem. Předkladatelkou použité metodiky nejsou sice nijak náročné na vlastní provedení, nicméně vyžadují vysokou míru pečlivosti při jejich provádění a zároveň i zkušenosti při jejich vyhodnocování. Proto je jistě potěšitelné, že obě tyto vlastnosti předkladatelka svými výsledky prokázala. Jako další pozitivum této práce hodnotím i snahu validovat nově vyvíjenou metodiku na širším spektru biologických modelů u kterých byla experimentálně navozena buněčná smrt různými induktory.

Na druhé straně je potřeba poukázat i na slabiny a limity této práce. Ty se týkají jak formálních, tak obsahových záležitostí. V teoretickém úvodu je např. velmi volně operováno s termíny programovaná buněčná smrt a regulovaná buněčná smrt, a to i přes to, že se předkladatelka často odkazuje na referenční jasně deklarovanou nomenklaturu buněčné smrti, tak jak byla publikována ve své poslední verzi z roku 2018. Shrnutí podstaty a mechanismů apoptózy se může dnes ve světle našich znalostí jevit jako jednoduché, ale bohužel tomu tak není. V předkládaném úvodu o apoptóze jsou tedy uvedeny její základní a kanonické mechanismy, ale nejsou naopak ani zmíněny další, které mají potenciální vliv i na řešenou problematiku. Týká se to např. dalších enzymů, organel či procesů aktivně zapojených do apoptózy (lyzozomu, ER, kalpains, katepsiny atd). Trochu účelově je v tomto přehledu zmíněna i stresová kináza JNK, ale jsou opominuty další MAPK (p38, ERK), které se také často aktivně účastní proapoptické signalizace. **Potenciálně největším nedostatkem prezentovaného přehledu, a to zejména s ohledem na použité induktory apoptózy v experimentální části práce, je naprosté opominutí klíčové signalizace spojené s genem p53!!**

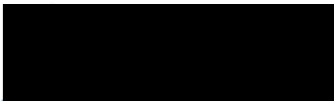
V přehledu metodik pro detekci apoptózy postrádám i velmi standardní hodnocení (průtokovou cytometrií, mikroskopicky či spektrofluorimetry) míry apoptózy pomocí barvení akridinovou oranží a ethidium (propidium) jodidem. Naopak nemohu souhlasit s uvedením metodik jakými jsou např. WST, či XTT či stanovením glutathionu jako referenčních přístupů pro biochemické hodnocení přítomnosti apoptózy. Zde by bylo třeba uvést např. metody stanovení translokace cytochromu c do cytoplazmy, měření mitochondriálních membránového potenciálu či permeabilizace lyzosomálních membrán a zejména stanovování aktivit enzymů – kaspáz, kalpainů, DNAáz atd. S tím souvisí i vlastní experimentální záběr; kdy porovnávání vyvíjené metody s WST či glutathionem nedává smysl. Naopak pro robustnější výsledky by bylo bývalo vhodné použít stanovení sub G₁ buněčné frakce či PS-Annexinu, které často slouží pro rutinní kvantifikaci přítomnosti apoptózy ve studovaném modelu.

V neposlední řadě je škoda, že v rámci diskuze a závěru nebyl podán stručný souhrn tzv. nedostatků či omezujících faktorů (limitations), které nemohla práce postihnout a které bude třeba dále do budoucna studovat.

K práci mám dále několik dalších výtek, komentářů a otázek:

1. Formálně se opět na textu této práce ukazuje, jak obtížné je sladit jazykovou, stylistickou a obecně terminologickou formu v případě, kdy některé odborné termíny původem z anglického jazyka jsou přeloženy a „počeštěny“ a jiné ne. Vede to pak na mnoha místech textu k nekonzistentnímu používání různých jazykových forem. Dále, proč předkladatelka upravila Obr. 1 (str. 16) do české podoby, zatímco u ostatních nechala anglickou?
2. U prezentovaných mikrofotografií je standardem uvádět měřítko, které však mnohdy chybí (např. Obr. 7 – str. 29, naopak u Obr. 18 – str. 76 jak se zdá jsou měřítka zakomponována, ale v legendě nespecifikována).
3. Obr. 8 – nepřesné převzetí a označení elektron optické metody – A) je správně transmisní elektronová mikroskopie za B) chybí uvedené skanovací elektronové mikroskopie (SEM).
4. Předkladatelka deklaruje výsledky získané na 4 stabilizovaných liniích Hep2G, HK-2, A549, SH-SY5Y. V popisu (str. 50) úplně chybí jejich identifikace – tzn. o jaký buněčný typ se jedná a hlavně, jaký je jejich zdroj. Uváděná autentizace těchto linií se provádí v případě, že existují pochybnosti o jejich identitě jako např. pokud je získáme z neoficiálního zdroje. Což dle přiložených publikovaných článků není pravda – alespoň některé byly získány z ATCC, kde je autentizace garantována. Kromě toho v anglických tezích je tato identifikace uvedena.
5. Jaká kritéria vedla předkladatelku k selekci buněčných linií pro validaci nové metody?
6. V diskuzi při porovnávání nově vyvinuté metody s dalšími metodikami postrádám hlubší vzhled, a to zejména s ohledem na míru citlivosti jednotlivých metod.
7. Může autorka blíže specifikovat, v čem spočívají nevýhody a limity jí vyvinuté techniky detekce apoptózy?
8. Velká výhoda metody TUNEL spočívá v tom, že se dá využít i pro tkáňové řezy a biopsie ve zvířecích modelech i u vzorků získaných od lidí. Neuvažovala/nezkoušela autorka aplikovat nově vyvinutou metodiku i u těchto modelů? Popřípadě, jaká jsou její očekávání?

Prezentovaná disertační práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v oboru analytická chemie. Uchazečka prokázala samostatné tvůrčí schopnosti i ochotu a schopnost spolupracovat v rámci širšího vědeckého kolektivu, což je patrné nejenom z práce samotné, ale i z její publikační aktivity. Uvedenou práci doporučuji k obhajobě a zároveň doporučuji uchazečku Mgr. Pavlínu Majtnerovou k dalšímu řízení k získání titulu PhD.


prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.