

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Martina Golana

**Influence of freezing and thawing process on cryopreserved cells nuclei and surfaces.
Functions and physico-chemical properties of cryoprotectants**

Školící pracoviště: Fyzikální ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Obor: Fyzika

Specializace: Biophysics, Chemical and Macromolecular Physics

Školitel: doc. Irena Kratochvílová Ph.D.

Téma a aktuálnost práce. Doktorská disertační práce Mgr. Golana se zabývá vlivem vybraných kryoprotektantů na proces mrazení a rozmrazování buněk. Řešená problematika je důležitá a aktuální z pohledu obecné vědy, ale zejména s ohledem na široce rošířenou techniku zmrazování lidských reprodukčních buněk pro budoucí použití.

Zpracování, cíle a výsledky práce. Po stránce formální má předložená disertační práce velmi vysokou úroveň. Práce je napsaná dobrou angličtinou, je přehledná a dobře dokumentovaná, na více než 150 stranách je citováno téměř 200 prací. Členění disertační práce je tradiční (úvod, metody, výsledky, diskuze, závěry, literatura) a dobře odráží diskutovaná témata. Práce je podložena šesti publikacemi, jichž je Mgr. Golan spoluautor. dvě publikace jsou prvoautorské.

Úvodní část poskytuje stručný přehled používaných kryoprotektantů, jejich vlastností a zdůvodňuje jejich výběr ve studiu.

Metodická část uvádí na 30 stranách impresivní přehled použitých technik, od výpočtů molekulární dynamiky, přes kalorimetrii, x-paprskovou difrakci, Ramanovskou spektroskopii, AFM, až k mechanickým studiím mražených buněk a mikroskopickým technikám odhadů míry defektů nukleární struktury rozmražených buněk.

Z hlediska ovlivnění fázových přechodů pracovali autoři se dvěma kategoriemi kryoprotektantů: anti freeze protein ApAFP752 ovlivní růst ledových krystalů přímou interakcí se vznikajícím krystalem, studované organické látky (DMSO, trehalóza) ovlivňují termodynamiku mrazícího procesu. Z pohledu buněčného působení je zásadní rozdíl mezi proteinem ApAFP752, který působí pouze v extracelulárním prostoru, dále trehalózou, která vnikne do buňky, ale ne do jejího jádra, a konečně DMSO, který vniká až do buněčného jádra a působí následně největší kondenzaci chromatinu. Dle výsledků studií je pak DMSO i neúčinnějším agens pro zachování největšího podílu životaschopných buněk po rozmražení (viabilitu). Byla nalezena dobrá korelace mezi kondenzací chromatinu a viabilitou po zamražení a rozmražení myších buněčných linií NHDF a MCF7s různými kryoprotektanty. Je třeba se vyhnout zamražení buněk v S-fázi, kdy dochází k největšímu počtu štěpení DNA. Velká pozornost se věnuje měření mechanických vlastností buněk při zmrazování a bylo ukázáno, že AFM lze použít jako neinvazivní sondu pro schopnost buňky obnovit po rozmražení standardní buněčné cykly.

Celá práce je systematickým náhledem na důsledky procesu kryoprotekce od jeho působení v extracelulárním prostoru až do jádra buněk. V práci se podařilo kombinovat různé metodiky pro stanovení vlivu mražení a rozmrazování různými kryoprotektanty mimo buňku, v buněčném prostoru mimo jádro i v buněčném jádře.

Poznámky a otázky. X-paprsková difrakce diskutovaná na straně 62: nemohla být difrakce ve vzorku s nemrznoucím proteinem AFP ovlivněna přítomností tohoto proteinu a ovlivnit srovnání s difrakcí malých molekul?

Často používané kryoprotektanty jsou polyalkoholy, typicky polyethylenglykoly. Na několika místech jsou zmiňovány, ale studovány systematicky nebyly. Proč?

Hodně pozornosti bylo v práci věnováno měření mechanických vlastností buněk (ne)ozářených gama zářením pomocí AFM před a po zmražení. Bylo by možné detekovat poškození DNA přerušením dvoušroubovice (dsDNA breaks) přímo AFM?

Jsou závěry udělané na myších modelových buňkách či tkáních přenosné na lidské buňky?

Přestože jde v rámci celé práce o okrajovou věc, nemůžu se ubránit poznámce o nedostatečnosti 10 nanosekundové simulace interakcí kryoprotektantů s vodou.

Závěr. Disertační práce přináší originální poznatky a ukazuje na autorovu schopnost multidisciplinárního přístupu k výzkumu, který je pro řadu biologických problematik zásadní. Mgr. Martin Golan prokázal předpoklady k samostatné tvůrčí vědecké práci. Doporučuji proto oborové radě doktorského studijního programu práci přijmout v předložené formě jako podklad pro udělení titulu „PhD“ za jménem.

V Praze 12. června 2018

Bohdan Schneider