



V Olomouci 11. června 2018

Věc: Posudek na disertační práci Mgr. Martina Golana

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

**Účinky procesu kryoprezervace na jádro a povrch buňky. Funkce a fyzikálně-chemické
vlastnosti kryoprotektantů.**

Předložená disertační práce představuje ucelenou formu sdělení strukturovaného standardním způsobem. Věnuje se trvale využívané problematice vlivu procesu zamražení buněčných kultur na jejich životaschopnost a strukturu a poškození jaderné DNA a chromatinu obecně. Význam této práce spočívá ve velmi důležité snaze popsat mechanismy působení vybraných kryoprotektantů DMSO, trehalosa antifreeze proteinu a dalších na proces mrznutí vody a procesy uvnitř buněk, které jsou ošetřeny hlubokým zamražením. Jednotlivé cíle jsou jasně definovány, vysvětleny a vyhodnoceny s použitím vhodných statistických nástrojů.

Práce je psána anglicky. Autor volil plnou verzi disertační práce. V první části představuje současný pohled na problematiku kryoprotekce chování roztoků a kryoprotektiv za měnící se teploty a vlivu nízké teploty na buňku.

Po úvodu následuje přehled použitých metod, které zahrnují metody *in vitro* analýzy chování roztoků během měnící se teploty (DSC, X-difrakce) i metody *in silico* modelování a dále metody charakterizující některé morfologické (fluorescenční mikroskopie), fyzikální (AFM) a funkční (FM, průtoková cytometrie) parametry dvou studovaných buněčných linií NHDF (normal human skin fibroblasts) a MCF7 (mammary carcinoma cells) lišících se intenzitou proliferace a dalšími vlastnostmi. Pro hodnocení vstupu trehalosy do ošetřených buněk byla použita sada metod hmotnostní spektrometrie LC-MS/MS a DESI-MS. V metodické části je uvedeno a jasně popsáno provedení jednotlivých dílčích kroků..

Výsledková část a diskuze je jasně a srozumitelně zpracována. Obsahuje 39 obrázků a 6 tabulek. Nejdříve byla charakterizována interakce molekul kryoprotektiv s vodou se zdůrazněním rozdílů mezi DMSO, trehalosou a AFP. V další části se autor věnoval charakterizaci chování a morfologii buněk ošetřených vybranými kryoprotektivy. Byla hodnocena jednak životaschopnost buněk (Annexin B a 7-AminoActinomycin D), tuhost buněk (AFM) a dále byla detailně charakterizována intaktnost jaderné DNA a celkové uspořádání jádra po ošetření kryoprotektivy před a po kryogenním procesu. **Velmi důležité pozorování se týká srovnání životaschopnosti buněk a integrity jaderné membrány (TO-PRO-3 a lamin A/C barvení) a zejména uspořádání (kondenzace) chromatinu po expozici různým kryoprotektivům, před a po vlastním kryogennímu procesu, identifikace poškození DNA a vzniku DSB (barvení γ H2AX a TP53BP1).**

Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

www.lf.upol.cz

<http://imunologie.upol.cz/>

Přednosta ústavu:

Prof. Mgr. MUDr. Milan Raška, Ph.D. .tel.: +420 585 632 751, e-mail: milan.raska@upol.cz

Sekretářka:

Jana Rábková, tel.+420 585 632 752, e-mail: jana.rabkova@upol.cz



DMSO jako dlouhodobě používané kryoprotektivum případně v kombinaci s trehalosou se ukázal jako nejlépe protékající, což jistě uklidní všechny laboratorní pracovníky, kteří DMSO při dlouhodobém uchování buněčných linií používají.

Celkově oceňuji autorovu schopnost obsáhnout rozsáhlé spektrum metod a schopnost interpretace experimentálních dat. Rovněž diskuse na závěr práce potvrzuje autorův literární přehled, orientaci v problematice jak fyzikální a chemické tak i biologické vnímání pozorovaných jevů. Originalita práce spočívá zejména v komplexním hodnocení procesu kryoprotekce od interakce kryoprotektiva s vodou a buněčnými strukturami až po zhodnocení životaschopnosti a poškození buněčného jádra jako klíčové struktury pro zajištění kvality kryoprotekované buněčné kultury použité v dalších experimentech. Autor prokázal schopnost kriticky vybrat metodické přístupy a zhodnotit naměřená data a uvést je do kontextu současného poznání a splnil tak požadavky na disertační práci.

Mgr. Martin Golan je autorem 6 kvalitních časopiseckých sdělení z nichž u dvou je prvním autorem a dále autorem či spoluautorem 4 konferenčních sdělení.

Prosím, aby jako součást obhajoby disertační práce byly odpovězeny tyto otázky:

1. Proč jste zvolil hodnotu 30 γ H2AX/53BP1 fokusů jako hraniční?
2. Jak byste minimalizoval množství S fazických buněk v kultuře připravované k zamražení?
3. Myslíte, že schopnost kondenzovat jaderný chromatin by byla použitelná pro skrínig vhodnosti použití látek jako nových kryoprotektivů?

Závěrem lze konstatovat, že předložené dílo splňuje všechna kritéria kladená na disertační práci. Autor prokázal nejen schopnost samostatné vědecké činnosti, ale i schopnost získané výsledky posoudit a vyvodit odpovídající závěry. Úroveň zpracování i prezentace získaných dat svědčí o velmi dobrých teoretických i praktických znalostech doktoranda. Na základě uvedených skutečností konstatuji, že se jedná o zdařilé vědecké sdělení, a doporučuji proto disertační práci Mgr. Martina Golana k obhajobě s tím, aby mu byl v případě úspěšného průběhu obhajoby udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.
Ústav imunologie LF UP Olomouc