Posudek oponenta na diplomovou práci

☐ oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Tomáš Hendrych
	Datum: 27. 5. 2021

Autor:
Bc. Julie Kadlecová

Název práce:
Charakterizace nově vyvinutých fluorescenčních sond v buněčných systémech

Cíle práce

Cílem práce bylo charakterizovat nově vyvinuté na pH citlivé fluorescenčně značené křemíkové nanočástice - jejich vliv na životaschopnost buněčných linií lidských keratinocytů, interakci s těmito buňkami, jejich lokalizaci v rámci buněk a dále pak pomocí nich charakterizovat vnitrobuněčné pH.
Za tímto účelem bylo dalším cílem zavést metody na měření buněčného metabolismu a vnitrobuněčného pH pomocí standardních metod.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO ~~NE~~
Rozsah práce (počet stran): 111
Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO ~~NE~~
Je uveden seznam zkratek? ANO ~~NE~~

Literární přehled:
Odpovídá tématu? ANO ~~NE~~
Je napsán srozumitelně? ANO ~~NE~~
Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO ~~NE~~
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO ~~NE~~

Materiál a metody:
Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO ~~NE~~

Kolik metod bylo použito?
Rozsah metod použitých autorkou je (na diplomovou práci) relativně široký. Zahrnuje kultivaci buněčných linií, měření jejich proliferace a metabolické aktivity pomocí MTS testu a SeaHorse metody, průtokovou cytometrii a různe metody fluorescenční mikroskopie včetně pokročilých technik jako je 3D konfokální mikroskopie či super-rezoluční STED.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO ~~NE~~
Ale s velkými výhradami. Občas jsou popsány trochu zmateně, někdy nepřesně a často se zbytečně se vyskytujícím opakováním postupů, které je možné shrnout do jednoho odstavce (především příprava vzorků pro jednotlivé mikrkoskopické metody).

Experimentální část:
Je vysvětlen cíl experimentů? ANO ~~NE~~
Je dokumentace výsledků dostačující? ANO ~~NE~~ - v čem jsou nedostatky?
Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?
ANO ~~NE~~ – co chybí, v čem je nedostačující?

Diskuze:
Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO ~~NE~~

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO ~~NE~~
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO ~~NE~~

Závěry (Souhrn) :
Jsou výstižné? ANO ~~NE~~

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální úroveň je kamenem úrazu předložené práce. Text je obtížně čitelný, nekonzistentní, opakují se v něm informace či celé pasáže textu, které jsou již uvedeny v metodách a v popiscích obrázků, což zbytečně komplikuje orientaci v textu. Leckde jsou chybně odkazy na grafy či tabulky. Popisky tabulek a grafů jsou na některých místech chybné či zavádějící. Výčet chyb, nikoliv úplný, přikládám níže.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly v rámci možností naplněny. Je zřejmé, že autorka vynaložila nemalé usilí k charakterizaci externě dodaných nanočástic, které (ani v jedné z dodaných šarží), nesplňovaly předpokládané parametry. I přes špatnou formální úrověň zpracování autorka v práci sleduje logicky vystavěný a ucelený myšlenkový koncept.

Otázky a připomínky oponenta:

* V úvodu zmiňujete, že buňka udržuje vnitrobuněčné pH odčerpáváním H^+ z cytosolu do okolí. Podílí se v případě lidských buněk na pH homeostasi nějakým způsobem třeba i lysosom?

* V úvodu vyzdvihujete pro měření pH raciometrické fluorofory. Jaká je přednost raciometrických senzorů oproti intenzitním?
V případě FITC uvádíte (obr.č. 5) závislost jednoho maxima intenzity emise fluorescence na pH při jedné excitační vlnové délce. Je či není FITC raciometrická sonda?
Pro měření pH pak uvažujete, že by se měřil poměr intenzit FITC / rhodamine B. Proč je měřen poměr vůči rhodaminu B? Pokud chápu správně, implicitně to je v práci zmíněné, nicméně zasloužilo by si to zmínit explicitně.

* Rakovinové buňky A431 mají dle vašeho měření nižší pH nez zdravá buněčná linie HaCaT, což diskutujete (s ohledem na další indicie) možným přechodem k apoptóze. Máte nějaké vysvětlení proč za stejných podmínek k tomu u zdravých buněk HaCaT nedochází?

* Z intenzity fluorescenčního signálu 2-NBDG z buněk usuzujete na zvýšenou glykolytickou aktivitu A431. Glykolýza ovšem v přitomnosti 2-DG analogu neprobíhá, nejedná se tedy metodicky spíše o důkaz zvýšeného transportu glukózy do buněk?

<u>připomínky:</u>
* str.18 kapitola 3.3: bylo by vhodné uvést citace k jednotlivým metodám měření pH. Pro úplnost by bylo také dobré zmínit hojně používanou metodu měření pomocí pH citlivé varianty GFP

* str.18: popis principu fluorescence je nepřesný
např.: „poté nevyhnutelně dochází k návratu do původního stavu za vyzáření energie“ -

k návratu může vést řada dalších procesů

„Fluorescenční molekuly … jsou takové chemické látky, které jsou schopné prostřednictvím obsažené reaktivní sloučeniny vázat nukleofilní skupiny (OH, SH, ...)“ – tomu nerozumim, co znamená

* str. 19: „…a jejich vyšší disociační konstanta pKa přispívá k vyšší citlivosti na okolní pH.“ – jak vyšší pKa přispívá k vyšší citlivosti?

* str. 20: „Princip spočívá v různé sensitivitě senzoru k vodíkovým protonům při odlišných vlnových délkách emise nebo excitace.“ – tato věta je poněkud zvláštně a řekl bych špatně formulovaná. Princip bývá obecně v tom, že se liši spektrální vlastnosti protonované a deprotonované formy daného fluoroforu buď na úrovni emisních a/nebo excitačních spekter

* str.21: „V tomto případě pH ovlivňuje absorbanci snímanou ve dvou vlnových délkách, zatímco emisní maximum je určené pouze jedno“ – pravděpodobně má být excitaci

* str.26: „2 mM (1 %) L-glutaminu“ – jedná se pravděpodobně o 1% zásobního roztoku, což není uvedeno

* str.29: „Hodnoty absorbance byly změřeny … při nastavené vlnové délce 490 nm a při 655 nm, což byla hodnota pozadí, která se následně odečítala.“ – trochu těžkopádně napsané

* str. 32 špatně označen odkaz na graf (č.3 má být č.4)

* str 33. v tabulce se vyskytují špatné znaky

* str.35: „HBSS pufr“ bez jakékoliv další specifikace (výrobce/složení/koncentrace…)

* str.39: kyselý pufr A, zásaditý pufr B bez jakékoliv další specifikace
jedná se o kalibrační pufry pro pH měření, znalost koncentrace a složení je žádoucí

* metoda SeaHorse by si zasloužila lepší popis toho jak funguje, především z hlediska užití jednotlivých modulátorů.

* str.46: v textu chybný odkaz na grafy (7-9 má být 8-10)

* str.46: DT buněk A431 vychází delší než u HaCaT. Ale pokud dám na sebe přiložené „**reprezentativní**“ grafy, roste evidentně rychleji A431, tedy opačně.

u těchto hodnot **není uvedená chyba měření**;
graf je nevhodný z hlediska osy x, jejíž škálování je podivné (ani lineární ani logaritmické).

* str.49: v popisu v grafu jiné hodnoty než uvedené v textu (10/15/20k vs. 5/10/20k)
dále se domnívám, že by hodnoty MTS měření měly být vždy **normalizované** na počet buněk (tak jako u pozdějších exp. např pomocí barvení CyQuant)

* str. 50: chyba v popisu grafu: „Zelená čára značí 100 % (kontroly), červená čára 75 % …. Červená čára značí 100 % (kontroly)“
dále v textu uvádíte, že pod hranicí 75 % jsou A431 pro konc NP 100ul/ml …“ což ovšem

z grafu není patrné. Vizuálně to vypada stejně jako F-R 25ug-ml u HaCaT u kterrých ale uvádíte „Nejvíce se blížila hodnota 76 %...“

* u konfokálních snímků chybí měřítko

* str. 80, graf 45: „Relativní intenzita fluorescence pro emisní maxima SNARF-1 při 580 nm a 640 nm“ – zavádějící popisek. Jedná se o emisní spektra SNARF-1 pro pH6 a pH9 (dle uvedeného zdroje); což už je (a mnohem lépe) zobrazeno v úvodu (obr. č. 4)

* str. 80, kalibrace:
Kalibrace ve třech bodech opravdu **nestačí**. Závislost SNARF-1 na pH rozhodně **není lineární** (ani v měřeném intervalu). Chybí chyba měření.

* je velká škoda, že u vizualizace lokalizace SNARF-1 na konfokálním mikroskopu nejsou uvedeny obrázky z jednotlivých kanálů, ale pouze jejich kompozice. V případě značení lysosomů je uveden pouze vzorek HaCaT, což je škoda s ohledem na to, že šlo o prokázání toho, že SNARF-1 nelokalizuje do lysosomů především u A431; z uvedených obrázků z widefield-mikroskopie osobně nedokážu rozhodně říct, zda je lokalizace čistě mimo lysosom.

* graf č. 60,61: není uvedeno, co značí černá čára v grafu. pravděpodobně se jedná o treshhold pro pozitivní událost?

* tab.č.11: nadpis „2-DG %“

* str.92,100: „Identickou metodou je zjištěna hodnota ECAR, tedy extracelulární okyselování, zastupující indikátor glykolýzy (nebo je zejména produktem/výsledkem glykolýzy) .“ – poněkud těžkopádná formulace

* v seznamu literatury u některých citací není uveden rok (místo něj uvedeno: „no date“)

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

☐ výborně ☐ velmi dobře ☐ dobře ☐ nevyhověl(a)

Podpis oponenta: