



MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, V.V.I

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Oleksandra Chernyavského
„Improved Methods of Image Acquisition and Analysis of Tissues and Cells by
Confocal and Multi-photon Microscopy“

Předložená disertační práce se týká přizpůsobení a zdokonalení moderních mikroskopických metod pro jejich využití ve velmi specifických biologických aplikacích. Disertace vznikala pod vedením Dr. Lucie Kubínové na Fyziologickém ústavu AV ČR v Praze. Disertace má formu souboru publikací, který zahrnuje čtyři původní práce a jeden přehledný článek. Mgr. Oleksandr Chernyavskiy je na zahrnutých publikacích dvakrát uveden jako první autor.

Soubor publikací je uveden krátkou informací o historii mikroskopie a moderních mikroskopických technik. Podrobněji jsou diskutovány zejména případy využití metody dvoufotonové mikroskopie. V disertaci nechybí také stručný popis použitého zařízení, metod zpracování obrazu, komentář k prezentovaným publikacím a závěrečné jednostránkové shrnutí dosažených výsledků.

Za nevýznamnější považují metodický přínos Mgr. Chernyavského ve studiích kvasinkových kolonií. Jedná se o velmi specifickou aplikaci, neboť pomocí fluorescenční mikroskopie jsou analyzovány buněčné populace prostorově uspořádané do kolonií specifických tvarů. Nepochybně se jedná o unikátní přístup, který je umožněn právě zavedením dvoufotonové mikroskopie prostupující hlouběji do kolonie bez narušení buněk v jejích okrajových částech. Tento metodický úkol Oleksandr Chernyavskiy řešil ve dvou zahrnutých publikacích, z nichž jedna byla zveřejněna ve velmi prestižním časopise *J.Cell Biology*. Obě práce jsou postaveny na zvládnutí této mikroskopické techniky, které bylo umožněno zejména velmi pionýrským přístupem disertanta. O kvalitě a unikátnosti výsledků svědčí také zveřejnění získaných mikroskopických obrazů na obálkách obou časopisů.

Další specifickou aplikací dvoufotonové mikroskopie, která je v disertaci řešena, je zobrazení myšího experimentálního melanomu *in vivo*. Disertant je na zahrnuté publikaci prvním autorem. Výsledky ukázaly, že použitý mikroskopický přístup může být také využíván při sledování modifikací kožní tkáně různými klinickými zásahy.

Třetí oblast, která je v této disertační práci řešena, je mikroskopická analýza a porovnání tvarů specifických silně barvitelných zrn bílkovin, tzv. „Reinekových krystalů“, v sekrečních Leydigových buňkách. Použitím stereologických metod byly získány nové informace o jejich počtech a organizaci jejich krystalové mřížky. Optimalizací metod zpracování získaných mikroskopických obrazů se autorům podařilo překonat nedostatky využití jak transmisní elektronové, tak i běžné optické mikroskopie. Multi-fotonovou mikroskopii se autor disertace také zabývá také v krátkém přehledném článku jehož je prvním autorem.

Vzhledem k tomu, že výsledky prezentované v publikacích již úspěšně prošly recenzním řízením před zveřejněním, lze konstatovat, že podobně jako použitý experimentální přístup jsou dosažené výsledky na vynikající úrovni. Zadaný cíl zdokonalit dostupné mikroskopické metody pro tři specifické biologické aplikace byl splněn.

Otázky:

- 1) V práci uvádíte obraz kvasinkové kolonie získaný multi-fotonovým mikroskopem po jejím barvení sacharidů buněčných stěn pomocí ConA – Alexa Fluor, kdy byla obarvena pouze povrchová vrstva buněk kolonie. Ověřovali jste také možnost skenování kolonie po barvení buněčné stěny pomocí malých molekul, např. Calcofluor White a v oblastech vhodných pro UV-excitovanou barviva? Bylo možno očekávat hlubší probarvení kolonie?
- 2) Je možno multi-fotonovým uspořádáním omezit zhášení fluorescence některých fluorochromů, které je známé z prohlížení v 1-F?
- 3) Při kterém z uvedených tří způsobů skenování obrazu kolonie (shora, odspodu či z boku) a dalšího matematického zpracování, které jste použili, je možno získat nejlepší rozlišení vnitrobuněčných struktur v rámci kolonie?

Závěr: Disertační práce Oleksandra Chernyavského má dobrou úroveň. Autor prokázal schopnost práce s odbornou literaturou, spolupráce ve vědeckém týmu i schopnost sepsat vědeckou publikaci. Práce má všechny potřebné formální náležitosti a dle mého názoru vyhovuje kritériím, která jsou kladena na doktorskou disertační práci. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném průběhu doporučuji udělit autorovi titul PhD.

V Praze dne 20.5.2015

Ing. Jiří Hašek, CSc.