

## Oponentský posudek

### doktorské disertační práce Mgr. Oleksandra Chernyavskiyho

Disertační práce „Zdokonalené metody pro snímání obrazových dat a analýzu tkání a buněk pomocí konfokální a multifotonové mikroskopie“ Mgr. Oleksandra Chernyavskiyho je zaměřena na vývoj metodických přístupů v oblasti snímání a následné analýzy mikroskopického obrazu biologických preparátů. Kromě přehledu relevantní literatury a použitých metod tato práce obsahuje komentáře ke čtyřem vědeckým článkům autora publikovaným v recenzovaných časopisech. Sborníková publikace, která je rovněž připojena, komentována není. Čtyři komentované práce obsahují původní biologické nálezy, které jsou v interpretaci autora přímým výsledkem tří nově vyvinutých metodik. K této interpretaci a potažmo k závěrům práce mám některé výhrady uvedené níže.

Po formální stránce se jedná o kvalitně připravenou práci s minimem celkem nepodstatných nedostatků. Například, v části „Výsledky a Diskuse“ autoreferátu je uveden odkaz na neexistující Obrázek 1c, a označení proteinu Flo11 jako „drug efflux čerpadla“ (v české verzi autoreferátu) je řekněme nezvyklé. Jako mnoho dalších autorů, autor zaměňuje adjektiva „fluorescent“, tedy schopný fluorescence, event. fluoreskující, a „fluorescence“, tedy fluorescenční, využívající jevu fluorescence apod. Například, slovní spojení „fluorescent signal“ (str. 30) nedává smysl. Konfokální laserová skenovací mikroskopie je pod obvyklou zkratkou CLSM uvedena pouze v úvodu práce, dále je označována jako „1PE confocal microscopy“, kde 1PE značí „one-photon excitation“ (Seznam zkratk na str. 5). Ve třetí popisované publikaci je pod tento termín navíc poněkud nepřesně zahrnována i reflexní konfokální mikroskopie, u které k excitaci nedochází. Označení „1PE reflectance“ (str. 35) je tudíž zavádějící. Podobně nepřesné je i označení 2PE v případě SHG, kde se rovněž jedná o přímý elastický jev nezahrnující absorpci fotonů, což je mimochodem jedna z hlavních výhod SHG.

V komentovaných publikacích se autor zaměřil na tři okruhy zájmu: vizualizaci funkční morfologie kvasinkové kolonie, *in vivo* a *ex vivo* zobrazování myších melanomů a vizualizaci Reinkeho krystalů v normální a patologicky změněné tkáni mužských varlat. Jednotlivé okruhy se navzájem významně odlišují jak použitými metodami, tak relevancí k tématu práce. Mám dojem, že se autor mohl pokusit o souhrnný jednotící pohled na práci jako celek, např. v rámci Závěrů. Bez něj práce působí poněkud roztříštěně.

Dvě kvasinkové publikace vyšly v renomovaných biologických časopisech ( $\Sigma IF \approx 15$ ) a jsou často citovány (48 citací). Vědecká kvalita těchto publikací je nesporná. Je třeba však poněkud korigovat autorovy závěry, že to bylo právě použití dvoufotonové mikroskopie, které umožnilo analýzu struktury kvasničných mikrokolonií (str. 31 dole), a že byl vyvinut přístup umožňující neinvazivní sledování distribuce vybraného proteinu v čase a prostoru v rámci intaktní kolonie (závěr č. 1 na str. 41). Na obrázku č. 8 (str. 31) je z porovnání dosahu jedno- a dvoufotonové excitace fluorescence jasně patrné, že pomocí dvoufotonové excitace lze vybudit fluorescenci v denšní vrstvě kvasinek jen do hloubky vzorku přibližně dvojnásobné v porovnání s jednofotonovým buzením. Ačkoli v obrázku chybí měřítko, podle obrysů buněk lze odhadnout, že tato hloubka není významně větší než  $30\mu\text{m}$  (viz též obrázky S4-6 v připojené publikaci Váchová et al., 2009). Při tloušťce analyzovaných mikrokolonií  $150\text{--}400\mu\text{m}$  (obr. 4 ve Váchová et al., 2009) to znamená, že neinvazivním přístupem, tedy pozorováním dvoufotonově excitované fluorescence při pohledu shora či zdola, je možné registrovat fluorescenci jen z okrajových částí kolonie, nikoli z celého objemu. Podle mého názoru je ve zmíněných publikacích naopak zásadně přínosná myšlenka pořízení bočního pohledu na mikrokolonii, jemuž ovšem nutně předchází disekce, nejedná se proto o neinvazivní přístup, který by umožnil přímé pozorování vývoje kolonie v čase. Na druhou stranu naprosto souhlasím s autorem, že zde byla vyvinuta nová metoda ke sledování funkční strukturalizace kvasinkových mikrokolonií, která má velký potenciál dalšího využití.

Hlavní přínos prvoautorské práce věnované zobrazení myšního melanomu je bezesporu v kombinaci komplementárních experimentálních přístupů. Jmenovitě se jedná o kombinaci konfokální mikroskopie, a to jak fluorescenční, tak reflexní, s registrací dvoufotonově buzené fluorescence a zobrazováním kolagenových vláken pomocí generace druhé harmonické frekvence (SHG). Je tak pořízen vskutku komplexní obraz pozorované tkáně. Trochu mne proto zklamalo, že v popisované publikaci není této komplexity příliš využito: morfologická analýza umožňující detekci strukturních změn v pozorované tkáni byla následně provedena pouze z obrazů pořízených reflexní konfokální mikroskopií.

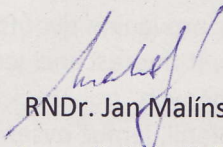
V publikaci zaměřené na vizualizaci Reinkeho krystalů v normálních a kryptorchidních varlatech je fluorescenční konfokální mikroskopie využita jen okrajově, a to k pořízení prostorové rekonstrukce vybraných krystalů. Rekonstrukce konfokálního obrazu byla provedena standardně s použitím obrazové dekonvoluce, v žádném případě se nejedná o novou metodu/přístup. Nelze ani souhlasit s autorovým závěrem: „prozkoumali jsme vlastnosti Reinkeho krystalů ... pomocí konfokální mikroskopie“ (závěr č. 3 na str. 41). Vzhledem k velikosti krystalů a vzájemným vzdálenostem mezi jednotlivými krystaly (viz obr. 3 v popisované publikaci Kozina et al., 2011) byla stereologická analýza počtu a morfologie krystalů provedena na datech z transmisního elektronového mikroskopu, nikoli z konfokálních obrazů.

Přes tyto nedostatky se domnívám, že předložená práce dostatečně dokumentuje, že autor je schopen samostatné vědecké práce. Souhlasím, aby Oleksandru Chernyavskiyemu na základě této práce byla udělena doktorská hodnost. Důrazně mu však doporučuji, aby se napříště vyvaroval ukvapených závěrů při interpretaci svých dat.

Jako podněty k diskusi předkládám následující otázky:

1. Ze zkušenosti vím, jak obtížné je rozdělit kvasinkovou kolonii hladkým řezem. Předpokládám však, že je to nezbytně nutné při přípravě preparátu pro snímání bočního pohledu na kolonii. Můžete blíže popsat způsob přípravy vzorku pro tyto experimenty?
2. Jaká je mez rozlišení SHG mikroskopie?
3. Jak byla provedena segmentace krystalů v obr. 2 popisované publikace Kozina et al., 2011? Vzhledem k malé vzdálenosti krystalů nemohou být důvodem k segmentaci naměřená konfokální data.

V Praze, 14. 5. 2015

  
RNDr. Jan Malínský, PhD.

Ústav experimentální medicíny AV ČR  
Víteňská 1083  
142 20 Praha 4