

Posudek disertační práce „Transportní mechanismy sekundárních metabolitů přes membrány rostlinných buněk“

Disertant: Mgr. Jan Kubeš, Katedra farmakognozie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Oponent: doc. PharmDr. Petr Babula, Ph.D., Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno a Fyziologický ústav LF MU, Kamenice 5, 625 00 Brno

Předložená disertační práce sestává ze 130 stran vlastního textu, který je členěn tradičním způsobem, a dalších 15 stran příloh. Po kapitolách „Úvod“ a „Cíl práce“ následuje kapitola „Teoretická část“. V této části se disertant věnuje několika tématům (rostlinné kultury *in vitro*, elicitace a stres u rostlin, *Trifolium pratense* a *Genista tinctoria*, flavonoidy, transport sekundárních metabolitů přes membrány), která jsou poněkud nesourodá a ne vždy zcela souvisí s tématem disertační práce. V této kapitole se, bohužel, disertant dopouští celé řady nepřesností a nesrovnalostí, ale také formálních chyb, což mírně snižuje kvalitu předložené disertační práce. Již v „Cílech práce“ disertant uvádí použití suspenzní kultury *G. tinctoria*, tedy používá zkratku pro název rodu. Toto by čtenáři ne zcela znalému problematice zcela jistě komplikovalo čtení práce a chvíli by mu trvalo, než by zjistil, že se jedná o rod *Genista* L. Dále, v teoretické části práce používá disertant pojem „tkáň“ pro rostlinná pletiva. Zde sice jako oponent chápu, jak toto vzniklo (plant tissues – přeložení pouze slova tissues jako tkáně), nicméně použití tohoto výrazu pro rostlinná pletiva svědčí o jisté nezkušenosti a nevědomosti disertanta, stejně tak psaní českého rodového jména s počátečním velkým písmenem. V souvislosti s používanou terminologií a definicemi je otázkou, zda jsou vždy používány a chápány zcela správně (např. zda je abiotický stresový faktor pouze fyzikální, zda se dá elicitace definovat jako látka nebo jev různé povahy, který je schopen vyvolat *fyziologickou* odpověď u konkrétního organismu, zda efekторы vázané na receptory zahrnují i proteinkinázy, zda jsou metalothioneiny přítomny u rostlin, atd.). Dále se domnívám, že v teoretické části není zapotřebí uvádět některá obecná nebo obecně známá fakta (historie a typy tkáňových kultur, složení kultivačních médií, atd.), naopak, pro vlastní práci bylo by účelné a velmi přínosné více rozpracovat ty konkrétní kapitoly, které mají přímou souvislost s řešenou problematikou, tedy věnovat se transportním mechanismům rostlinných buněk, jejich specifikům, distribuci v rámci rostlinných pletiv a orgánů a významu pro transport sekundárních metabolitů, což je tématem disertační práce. Kapitole věnované transportu sekundárních metabolitů přes membránu by prospělo uvedení přehledných tabulek, ve kterých by byly shrnuty jednotlivé transportní systémy s jejich (sub)buněčnou lokalizací, funkcí, případně strukturou a transportovanými látkami (sekundárními metabolity). Experimentální část je členěna standardním způsobem. V jednotlivých kapitolách se objevují drobné nepřesnosti (např. *nárůst obsahu protoplastů*, kap. 4.4.1). Vlastní výsledková část je obsáhlejší, nicméně, zasloužila by si větší pozornost; množství grafů bez příslušných, alespoň základních komentářů nebo podrobnějších legend ztěžuje orientaci v získaných výsledcích a oponent musí složitě dedukovat, co který graf znamená a jaké výsledky předkládá. V grafech disertant nepoužívá příslušné symboly (např. 1 $\mu\text{mol/L}$ místo 1 $\mu\text{mol/L}$). Výsledky by navíc mohly být přehledně shrnuty ve formě vhodné tabulky nebo schématu. Nicméně, získané výsledky jsou velmi zajímavé a již posloužily jako podklad pro tři impaktované práce. Kapitola „Diskuze“ je dle mého názoru zbytečně atomizována do jednotlivých podkapitol. Navíc se domnívám, že by bylo vhodnější výsledky opravdu diskutovat a ne je na tomto místě znovu pouze uvádět (prakticky v diskusi chybí jakékoliv odkazy na literaturu, jedná se o opětovný popis výsledků). Přehled zkratk uvádí vysvětlení některých z nich v anglickém jazyce, i když mají používaný český ekvivalent. V „Seznamu použité literatury“ je uvedeno celkem 228 odkazů, z nichž pouze šest je recentních, tj. z let 2015 a 2016. K disertační práci by mohly být přiloženy již publikované tři impaktované práce, a to ve formě přílohy.

Z předložené disertační práce vyplývá, že stanovené cíle byly splněny, a to za použití vhodných metodických přístupů. Disertant zvládl všechny metodiky nezbytné pro úspěšné řešení dané problematiky. Disertační práce je zajímavá, přináší originální výsledky, které již byly navíc publikovány ve formě tří publikací s impakt faktorem.

Konkrétní připomínky a dotazy k práci:

1. Mohl by disertant uvést přehled buněčných transportních systémů zapojených do transportu sekundárních metabolitů přes membrány, a to včetně jejich lokalizací, ve formě tabulky nebo přehledného schématu? V teoretické části dále disertant uvádí látky, které se používají ke studiu transportních procesů v souvislosti se sekundárními metabolity. Které z těchto látek se používají ke studiu transportu přes tonoplast? Je uvedený výčet látek kompletní?
2. Je verapamil opravdu *antagonistou vápníku*? Mohl by disertant uvést, ke studiu jakých procesů u rostlin se tato látka využívá a zda byla využita v některých pracích ke studiu transportu sekundárních metabolitů přes membrány?
3. Disertant uvádí, že suspenzní kultura *Trifolium pratense* byla připravena *rozrušením kompaktní hmoty kalusu do média pomocí sterilní pipety a několikanásobným nasátím a vypuštěním buněčných shluků automatickou pipetou a následně pasážovány po 14 dnech*. U suspenzní kultury *Genista tinctoria* postup odvození uveden není. Mohl by autor podrobněji charakterizovat tyto buněčné suspenzní kultury? Proč byly tyto kultury pasážovány po 14 dnech? Tento interval je přece jen, vzhledem k charakteru kultur, poněkud dlouhý. Z fotografií v příloze je zřejmé, že se jedná o nehomogenní shluky buněk, které nevykazují znaky optimální suspenzní buněčné kultury. Jaké tedy byly růstové charakteristiky použitých suspenzních kultur a viabilita na počátku a v průběhu experimentů? Domnívám se, že podrobná charakterizace chování kultur na počátku, ale i v průběhu experimentu, je zcela nezbytná pro další interpretaci a diskutování výsledků.
4. V přílohách 6 a 8 je u příslušných fotografií uvedeno, že se jedná o kultivaci suspenzních kultur na papírovém můstku. Je tomu opravdu tak?
5. Na základě čeho byly vybrány příslušné inhibitory transportu a jak byla určena koncentrace, která byla dále použita v experimentech?
6. Proč byl jako elicitor vybrán právě vanad, resp. síran vanadylu? Zde bych rád zmínil schopnost některých sloučenin vanadu inhibovat některé transportní systémy, např. ubikvitární Na^+/K^+ -ATPázu. Může tedy disertant vysvětlit, jaký je vliv použitého elicitoru na buněčné transportní systémy?
7. Mohl by disertant alespoň v krátkosti představit tři publikované impaktované práce včetně nových, originálních výsledků, které přinášejí?
8. Z poděkování je zřejmé, že se na získání výsledků podílel kolektiv více pracovníků z několika pracovišť. Mohl by disertant uvést vlastní podíl na prezentovaných výsledcích? Jaký je vlastní metodický přístup disertanta?

Byť mám k předložené disertační práci některé výhrady a připomínky, závěrem konstatuji, že splňuje požadavky kladené na tento typ práce v daném oboru. Poukazuje na schopnost uchazeče pracovat ve vědeckém týmu, používat sofistikované metody, zpracovat získané výsledky a odpovídajícím způsobem je prezentovat. V souladu s paragrafem 47 Zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb. **doporučuji** práci k obhajobě.

Doc. PharmDr. Petr Babula, Ph.D.

V Brně dne 15. listopadu 2016