

## **Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Anatolyje A. Filimonenka**

Název dizertační práce: **Vývoj ultrastrukturálních metod a jejich použití pro studium buněčného jádra**

Název dizertační práce v angličtině: **Development of ultrastructural methods and their application in studies on the cell nucleus**

Dizertační práce Mgr. Anatolyje A. Filimonenka je založena na osmi publikovaných článcích, jejichž spojujícím prvkem je metoda imunoznačení na buněčné ultrastrukturální úrovni. Touto metodou, která patří k základním nástrojům při studiu funkce jednotlivých molekul a molekulárních komplexů v buňce, se práce zabývá ve dvou úrovních:

První bych označila jako metodickou. Zde přináší nové nástroje pro statistické hodnocení klastrování a kolokalizace značených antigenů na ultratenkých řezech, dále rozšiřuje možnosti vícenásobné imunolokalizace díky zavedení nových markerů s různým tvarem dobře rozlišitelným v TEM a zabývá se také vlivem přípravy preparátů, včetně výběru metakrylátového zalévacího média, na zachování antigenních vlastností vzorku. Druhou úroveň považuji za experimentální, kdy především stereologická metoda pro zhodnocení významnosti kolokalizace byla využita k charakterizaci funkční mikroarchitektury replikačních a transkripčních domén DNA v He-La buňkách a dále při sledování aktivity jaderného aktinu a myosinu v průběhu fyziologické aktivace buňky.

Celkově má práce 135 stran a je napsána v jazyce anglickém. Většinu práce tvoří již zmíněných 8 článků (82 stran), ke kterým je připojen krátký úvod (6 stran) a v konci práce diskuze, závěry a vyhlídky do budoucnosti (13 stran). Práce je napsána srozumitelně, v textu se téměř nevyskytují formální překlepy. Navíc předložená práce působí i velmi pěkným grafickým dojmem. Všechny články v práci byly publikovány v letech 2000-2014 a ve čtyřech z nich je Mgr. Filimonenko prvním autorem. Impaktní faktor časopisů, v nichž byly články publikovány, kolísá v intervalu 2,22 až 3,36, což odpovídá průměrnému impaktu časopisů zaměřených na výzkum mikroskopických metod a jejich aplikací. Je zřejmé, že jednotlivé práce prošly před publikací důkladným oponentním řízením a proto se ve svém posudku spíše zaměřím na autorem doplněné části - úvod, diskusi a závěry PhD práce.

V úvodním přehledu se autor snaží stručně popsat jak teoretické základy, tak i důvody pro vylepšení dosud používaných metod pro stereologické zhodnocení možné kolokalizace, dále principy, na kterých je založeno vícenásobné značení, a vliv výběru zalévacího metakrylátového média na výsledky imunoznačení. Vzhledem k tomu, že v úvodu každé publikace je poměrně hodně prostoru věnováno vysvětlení současného stavu řešené problematiky, považuji tento souhrnný úvod celé PhD práce za stručný, ale dostatečný.

V závěru autor postupně diskutuje výsledky, které publikoval v jednotlivých článcích. Zde pro mě byly velmi přínosné výsledky, týkající se obecného použití metody imunolokalizace, jako je rozšíření možností vícenásobné imunolokalizace pomocí markerů jiných tvarů, jako např. Pd kostek či Au tyček, a vliv různých metakrylátových pryskyřic na výsledky značení. Poněkud překvapivé pro mě bylo zjištění, že při mrazové fixaci je výsledek imunoznačení více ovlivněn typem hledaného antigenu než při použití chemické fixace. Souhlasím s navrženým vysvětlením autora, že toto může být důsledkem extrakčních vlastností akrylátových pryskyřic, kterým lépe odolává chemicky fixovaný materiál, kdy se vytváří prostorová síť vazeb mezi fixačním činidlem a molekulami fixovaného materiálu. V souladu s tím je i další zjištění, že přídavek glutaraldehydu do substitučního média zlepšil zachování antigenicity vzorku, protože pravděpodobně sníží extrakci během infiltrace akrylovou pryskyřicí. Závěry práce autor formuloval jasně, srozumitelně a přehledně a v souladu s výsledky prezentovanými v publikovaných článcích.

Všechny experimenty dokazují kvalitní metodické a technické zázemí laboratoře prof. Hozáka, kde autor pracuje a má možnost využívat špičkových mikroskopických a jiných metod, které jsou pro získání nových poznatků v této problematice nutností.

Závěrem mám k práci Mgr. Filimonenka několik dotazů:

1/ Při porovnávání vhodnosti akrylátových pryskyřic jste používali Lowicrylové pryskyřice s označením KM4 a HM20. První z nich je považována za hydrofilní, druhá za hydrofobní. Měla tato skutečnost nějaký vliv na jejich citlivost k imunodetekci?

2/ Obě v první otázce uvedené pryskyřice je možné polymerizovat při teplotách hluboko pod bodem mrazu. Předpokládala bych, že u pryskyřice HM20, kdy lze provést prosycení pryskyřicí a polymerizaci při nižší teplotě, bude extrakce antigenů nižší a účinnost značení vyšší. Je tomu opravdu tak?

3/ Ve všech publikovaných pracích se autor zabývá nebo využívá k testování imunolokalizace antigenů v buněčném jádru, které je považováno za velmi stabilní a odolnou oblast z hlediska tvorby artefaktů v průběhu přípravy preparátů. Zajímal by mě názor autora, do jaké míry by mohla extrakce buněčných komponent metakrylátovými pryskyřicemi při použití mrazové

substituce ovlivnit výsledky imunolokalizace vybraných molekul v jiných částech buňky, např. v oblasti cytoplasmy?

4/ V souvislosti s dopracováním metody pro zhodnocení stupně kolokalizace do podoby softwarového nástroje bych poprosila autora o doplnění informací, do jaké míry je tento nástroj elektron-mikroskopickou komunitou využíván.

**Závěr:** Cíle disertační práce, týkající se řešení specifických problémů imunolokalizačních metod na ultrastrukturální úrovni, které si stanovil Mgr. Anatolij A. Filimonenko byly splněny. Získané výsledky byly zpracovány do osmi publikací, přičemž ve čtyřech z nich je Mgr. Filimonenko prvním autorem. K získání výsledků byly použity technicky náročné postupy elektronové mikroskopie, zahrnující od stereologických metod vyhodnocení density imunoznačení po přípravu preparátů pomocí vysokotlakého zamrazování následované mrazovou substitucí. Výsledky obsažené v dizertaci přinášejí řadu nových poznatků důležitých z hlediska rozvoje imunolokalizačních metod. Touto prací Mgr. Filimonenko prokázal, že je schopný samostatné vědecké práce. Na jejím základě doporučuji zahájit řízení pro udělení titulu PhD. podle aktuálně platných předpisů.

V Českých Budějovicích, 13.6.2014



Ing. Jana Nebesářová, CSc.  
Laboratoř elektronové mikroskopie  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i - Parazitologický ústav  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice  
Telefon: 387775402  
E-mail: nebe@paru.cas.cz