

Oponentský posudek na disertační práci Ing. Anety Křížové „Vývoj biofyzikální interpretace dat kvantitativního fázového zobrazování.“

Disertační práce Ing. Anety Křížové byla vypracována na Fakultě strojního inženýrství Vysokého učení technického v Brně, pod odborným vedením prof. RNDr. Radim Chmelíka, Ph.D. Disertační práce je podložena čtyřmi originálními články a jedním konferenčním příspěvkem. Z hlediska autorství vědeckých článků je Ing. Křížová prvním autorem na publikaci v *Journal of biomedical optics* a spoluautorkou na dvou publikacích v *PloS one* a jedné publikaci v *Scientific Reports*. Za zmínku také stojí autorčina účast na dalších devíti manuskriptech či konferenčních sděleních, které nemají přímý vztah k disertační práci. Na druhou stranu by bylo vhodné jednoznačně definovat autorčin podíl na jednotlivých publikacích.

V disertační práci se autorka soustředila na vývoj nových postupů, které by umožňovaly systematické a důkladné využívání dat získaných pomocí kvantitativního fázového zobrazování (QPI). V případě QPI jsou vysoce kontrastní mikroskopické snímky získávány na základě neinvazivního zobrazování založeného na měření suché hmoty buněk. V práci je popsána metodika, která byla použita k segmentaci buněk a na tomto procesu založená charakterizace buněk co se týče vyhodnocení buněčného tvaru, jeho dynamických změn a jakož i postihnutí změn v přesunu buněčné hmoty. Dále byl vyvinut postup dynamických fázových diferencí (DPD), který umožňuje vizualizovat přesun buněčné hmoty v čase. Tyto postupy byly poté aplikovány na analýzu různých biologických dějů, jako je rozlišování rozdílných typů buněčné smrti, změny tvaru v odpověď na stres a buněčná migrace ve 3D prostředí. Jediným nevyřešeným problémem zůstala 3D rekonstrukce buněk.

Předkládaná disertační práce je psána v českém jazyce a dělí se na kapitoly *Abstract/Abstrakt*, *Úvod*, pět výsledkových kapitol (*Metody biofyzikální interpretace QPI*, *Zobrazování pomocí CCHM ve 3D prostředích*, *Aplikace metod při analýzách buněčných smrtí*, *Aplikace metody DPD při sledování osmotických jevů*, *Aplikace metod ve výzkumu dynamiky buněk v kolagenových gelech*), *Závěr* a *Seznam použité literatury*. Po jazykové stránce je disertační práce jako celek velmi dobře zpracována a editována a obsahuje minimální výskyt chyb a nepřesností. V některých částech by textu určitě prospěl rozšířený popis či vysvětlení dané problematiky. Např. na str. 37 autorka tvrdí, že analýza buněk pomocí průtokové cytometrie nadhodnocuje počet apoptotických buněk, nicméně toto tvrzení není nijak vysvětlené. Také bych zmínil chybějící popisky os na obr. 31 na str. 40. V textu se píše, že byly analyzovány buňky těžší než 600 pg, ale to z grafu není jasné.

Po výsledkové stránce byla disertační práce Ing. Křížové primárně zaměřena na vytvoření nástrojů, které by umožnily analýzu mikroskopických dat získaných pomocí kvantitativního fázového zobrazování. V tomto směru je práce zaměřena spíše na vývoj postupů spojených s analýzou získaných biofyzikálních dat, a biologické aplikace jsou použity převážně na ověření funkčnosti vyvinutých

postupů. Nicméně i v tomto případě bylo dosaženo výsledků, které netriviálním způsobem rozvíjejí řešenou problematiku a následně byly použity ve dvou publikacích se spolupracujícími laboratořemi. Po výsledkové stránce hodnotím tedy předloženou práci jako výbornou a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

Na základě kvality disertační práce „Vývoj biofyzikální interpretace dat kvantitativního fázového zobrazování.“ Ing. Anety Křížové doporučuji, aby tato práce byla přijata pro řízení o udělení titulu Ph.D.

V Praze 28. 2. 2019

Tomáš Vomastek, PhD

Mikrobiologický ústav AVČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha-4
E-mail: vomy@biomed.cas.cz
tel: (+420) 241 062 166

K disertační práci Ing. Anety Křížové bych měl několik zvědavých, více či méně obecných dotazů:

1. První otázka se týká segmentace buněk. V kapitole 2.5.2. je popisována metoda segmentace buněk a jejich odlišení od pozadí, na základě přírůstku nebo úbytku suché hmotnosti v daném prostoru a čase. Daná oblast je považována za opuštěnou nebo nově zabranou, pokud: “právě jeden z fázových snímků φ_i , φ_{i+k} má nulové hodnoty“. Jak je v takovém případě řešena situace, kdy jedna buňka okupuje danou oblast v φ_i a druhá buňka tu samou oblast v φ_{i+k} ?

Segmentační algoritmy by v ideálním případě měly být schopné zvládnout obrazy různých buněčných typů, rozlišit více buněk s odlišnými morfologiemi a sledovat v čase změny v počtu buněk a jejich tvaru. V této práci prezentovaná segmentace využívá skutečnosti, že sledované buňky jsou buď samostatné nebo v případě mnohobuněčných seskupení (obr. 6) spíše skvamózní. Buňky tedy mají tvar, kdy tloušťka buněk klesá směrem k okraji, což dle mého soudu segmentaci značně usnadňuje. Jak se ale tato metoda segmentace vyrovná s buňkami, které tyto charakteristiky nemají? Např. MDCK buňky tvořící souvislý kuboidní epitel, kde každá buňka a tedy i epitel je asi 10-20 μm vysoký.

2. Druhá otázka se týká možnosti použití QPI k zobrazení intracelulárních struktur. QPI dokáže rozpoznat denzní intracelulární struktury jako jsou jádra a především jadérka. V některých buněčných typech jsou další prominentní strukturou aktinová stresová vlákna, která jsou přisedlá k bazální straně buňky. Pokud bychom předpokládali, že buňka obsahuje okolo 10 pg aktinu a zhruba 50 % aktinu je ve stresových vláknech, které zaujímají okolo 10 % buněčné plochy, bylo by možné tato vlákna vizualizovat?

Podobná otázka se týká i možné vizualizace stresových granulí, cytosolických agregátů, které se objevují, když jsou buňky vystavené stresovým podmínkám. Stresové granule mají průměr 100–200 nm, jsou složeny z proteinů a mRNA a slouží za zejména stresových podmínek ke skladování a následné reutilizaci mRNA ribonukleoproteinových komplexů. Byla popsána možnost vizualizovat tyto struktury pomocí QPI?

3. Dynamická fázová difference (DPD) je velice informativní metoda vizualizace změn v rozložení suché buněčné hmoty. V případě použití této metody zvláště u migrujících či invadujících buněk (např. obr. 39 a 40) by bylo určité vhodné ukázat i obrysy buněk či superpozici buněčného okraje. Není totiž jasné, zdali zaznamenané DPD je důsledek přesunu hmoty uvnitř buňky nebo důsledek buněčné protruze či retrakce. Zdá se, že autorka v tomto také nemá jasno. Na str. 16 například uvádí „Aby bylo možné rozeznat opuštěnou oblast a oblast nově zabranou buňkou“, jinde ale změny DPD popisuje jako přesun hmoty (str. 15: Proto jsme pro zviditelnění přesunů suché hmoty uvnitř buňky...). Chtěl bych proto autorku poprosit, zdali by mohla podrobněji prezentovat obrázek 40, kde je vidět impozantní úbytek hmoty na zadním okraji buňky. Je to retrakce zadního kraje či přesun hmoty v rámci buňky? Je ale zajímavé, že k nárůstu hmoty nedochází v oblasti těsně přiléhající, ale až na druhé straně buňky.
4. Experimenty s osmotickým šokem ukazují, že pro správné stanovení buněčné hmoty je nutná dostatečná hloubka ostrosti. Jak bylo tohoto požadavku dosaženo ve 3D experimentech? Dá se totiž očekávat, že buňky v kolagenové matrici mohou být rozprostřeny ve všech osách. Mohla by autorka navrhnout řešení, kterým by se dal kompenzovat problém s roztažením buněk v axiálním směru mimo hloubku ostrosti systému?