

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Ing. Kateřina Nováková: Studium transportu látek významných v životním prostředí přes biologické membrány a vývoj metod pro jejich stanovení

Cílem předložené disertační práce bylo studium chování vymezených typů fosfolipidových membrán zejména ve vztahu k jejich základním charakteristikám a ke zvoleným transportním procesům, pomocí technik elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS), DC-voltametrie (DCV), diferenční pulzní voltametrie (DPV), mikroskopie atomárních sil (AFM), hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a optické mikroskopie.

Úvodní pasáže věnovala autorka pojednání o významu biologických membrán zejména ve vztahu k buněčným (a subcelulárním) strukturám a k transportu biologicky významných resp. i škodlivých látek, cestou uplatnění různých mechanismů (difúzí, iontovými kanály, aktivním transportem, endo- a exocytózou). Popsala základní složky zmíněných biologických membrán (fosfolipidy, cholesterol, vnitřní a vnější proteiny, cukry), jejich roli a orientaci, způsoby jejich modelování, vytváření jednoduchých, stabilizovaných, ukotvených lipidových dvojvrstev, strukturu liposomů a micel. Bližší pozornost věnovala též protoplastům a jejich izolaci z rostlin, transportu sledovaných iontů Cd^{2+} , roli fytochelatinů (PC_2 a PC_3), uplatnění transportních bílkovin (transportanu TP10 a mastoparanu X), vazebným schopnostem mědi na fosfolipidy a přenosu šťavelanu přes modelovou membránu.

V experimentální části popsala nejen výše zmíněné techniky, které byly při práci využity, ale i bližší informace o použitém příslušenství, o speciálně upravených nádobkách, amalgamových elektrodách, o nalezených a zvolených postupech přípravy a charakterizaci modelových membrán, rostlinných protoplastů apod.

Do prezentace výsledků pak zahrнула zejména výrazné změny EIS-diagramů v závislosti na parametrech a modifikaci použité membrány, její stabilitě, na čase a na přítomnosti sledovaného transportního procesu. Šlo zvláště

- o poznatky o aplikaci fosfolipidové membrány s extrahovanými částmi reálných protoplastů a o jejich interakci s ionty Cd^{2+} , ve spojení s jejich transportem přes membránu
 - o poznatky o transportu PC_2 přes modelovou membránu za přítomnosti TP10 a mastoparanu X
 - o interakci iontů Cd^{2+} s lecitinem a následně kyselinou šťavelovou v souvislosti s otázkou transportu šťavelanu přes membránu
- a v neposlední řadě o vlastní praktické poznatky získané při optimalizaci přípravy membrán, při jejich charakterizaci a použití.

V závěru práce shrnula autorka nalezené poznatky, doplnila seznam použité literatury i kopie vlastních publikací, vesměs v impaktovaných vědeckých časopisech.


Celkově má práce vysokou odbornou úroveň. V rámci studovaného tématu přináší systematicky získané a ověřované, logicky řazené nové poznatky. Z jejího textu je zřejmé, že dosažené výsledky si vyžádaly namnoze kreativní řešení, potřebu kooperace s dalšími specializovanými pracovišti a seznámení se s příslušnými technikami. Rovněž formální stránka práce je pro čtenáře zcela srozumitelná a přehledná.

K práci mám tyto dotazy resp. poznámky, které však hodnocení disertace nijak nesnižují:

1. Na str. 69 (v horní části) se píše o „modelové membráně s extrahovanými částmi reálných protoplastů“ a na str. 79 (v horní části) o „začlenění protoplastů, které obsahovaly množství reálných transportérů“. Zjevně byly testovány různé postupy; může autorka zkušenosti z nich verbálně shrnout?
2. Otázka (námět mimo vytčené cíle): Z obr. 24 vyplývá, že připravený soubor protoplastů zahrnuje jak „živé“, tak i „neživé“ protoplasty. Předpokládejme, že by se v účinnosti u sledovaných procesů mohl projevit rozdíl mezi nimi. Nedalo by se např. při opakované proceduře přípravy (při její modifikaci nebo modifikaci podmínek) dospět k vysokému zastoupení „živých“ protoplastů? Porovnání s jiným souborem s jejich výrazně nižším zastoupením by pak poskytlo odpověď na otázku platnosti nebo neplatnosti zmíněného předpokladu. (V případě platnosti by šlo o velmi významný poznatek samo o sobě, i pro další výzkum.)
3. Dá se říct, že v případě komplexů mědi s kyselinou šťavelovou nebylo dostatečně průkazné, zda došlo k jejich transportu přes membránu z lecitinu?
4. Na str. 77 je uvedeno, že mez stanovitelnosti šťavelanů na m-CuSAE je příliš vysoká. Měď vykázala mnohem vyšší citlivost. V jaké oblasti potenciálů se nacházel měřený voltametrický signál?
5. Drobné poznámky:
 - str. 41 uprostřed, místo R zřejmě R_s
 - str. 72 (nahore): „Lineární část až (do) od koncentrace $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ PC}_2$ “?

Předložená doktorská dizertační práce je velmi kvalitní, přináší nové poznatky a svým provedením a zpracováním dokumentuje zaujetí autorky, její schopnosti vědecky pracovat a získané výsledky v kontextu s literaturou náležitě prezentovat. Doporučuji ji proto k obhajobě, na základě níž by mohl být Ing. Kateřině Novákové udělen titul PhD.

V Praze dne 24. 7. 2015



Doc. Dr. Ing. Ladislav Novotný, DrSc.
oponent

Oponentský posudek disertační práce

STUDIUM TRANSPORTU LÁTEK VÝZNAMNÝCH V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ PŘES BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY A VÝVOJ METOD JEJICH STANOVENÍ

Autorka: Ing. Kateřina Nováková

Předložená disertační práce sestává ze 105 stran vlastního textu včetně literatury a části příloh se 4 opublikovanými a 1 podaným původním sdělením v odborné literatuře. Struktura disertační práce odpovídá zvyklostem v oboru, je klasicky členěna do logických částí a je napsána s minimem nedostatků jako překlepů či určitých kostrbatých vyjádření, jež však nijak nesnižují její odbornou úroveň.

Část úvodu s teoretickou částí se zdá být na první pohled příliš obsáhlá, při čtení ale poskytne čtenáři důkladný přehled o problematice biologických membrán, možnostech studia transportu biologicky významných látek přes membrány a různých elektrochemických, mikroskopických metodách a metodách hmotnostní spektrometrie k charakterizaci lipidových membrán a stanovování množství přes ně prošlých látek.

Na teoretickou část navazuje experimentální část, která je sepsána stručně, ale v rozsahu úměrném jejímu významu pro disertační práci. Případné podrobnější informace lze dohledat v připojených kopiích vyšlých článků v příloze.

Část výsledků a diskuze je věnována optimalizacím přípravy fosfolipidové membrány, izolacím protoplastů, mikroskopickým charakterizacím membrán a protoplastů, aplikacím protoplastů na nosiče a sledováním transportu Cd^{2+} a fytochelatinu přes membrány za použití různých elektrochemických a dalších metod. Literatura je velmi obsáhlá (220 položek), aktuální a citovaná velmi pečlivě a jednotně. Dále již následuje seznam dosavadních odborných výstupů autorky disertační práce a část příloh.

Téma disertační práce je velmi aktuální, zvolená instrumentace odpovídá plnění cílů disertační práce. Disertační práce je napsána pečlivě, jen s malým množstvím překlepů, ponechaných anglických slovíček v překládaných legendách k obrázkům či méně šikovných obrátů, které však čtenáře neuvádějí v omyl. Snad je jen možné uvést některé názvoslovné prohřešky, které jsou zmíněny v části poznámek dále.

K disertační práci mám následující poznámky, komentáře a otázky:

1. Pro termín collision-induced dissociation šlo použít český ekvivalent, dtto pro tapping mode např. v seznamu zkratk nebo u zkratky DFT.

2. Názvy enzymů se v češtině píše dohromady, zrovna tak u organických sloučenin jako např. u fluoresceindiacetátu.

3. Obrázku 15 by svědčil český popis (totéž obr. 29).
4. Str. 48: 21-aminokyselinový peptid je úplně stejný jako 14-aminokyselinový peptid. Peptid TP10 asi není uveden správně.
5. Str. 69, tabulka 1: Jaké byly směrodatné odchylky či v procentech lépe relativní směrodatné odchylky u měření kadmia v kořenech a listech?
6. Obr. 30: Jde něco vyčíst z posunu potenciálu výšky píku s dobou akumulace?
7. Obr. 31 a předchozí text: Proč se akumulovalo zrovna při -280 mV? Co způsobuje zisk výsledného signálu typu píku?
8. Nadpisy sloupců v tabulce 2 nejsou úplně šikovní, rovněž indikace opakovatelnosti by byla užitečná.
9. Legenda obr. 21 by vzhledem k oběma osám mohla být analogická legendám u obrázků 19 a 20?

Závěrem chci konstatovat, že předložená disertační práce Ing. Kateřiny Novákové splňuje všechny nároky kladené na práce v oboru. Stanovené cíle byly splněny a zjištěné výsledky standardně opublikovány. Autorka ukázala, že je schopna získat nové informace, vyhodnotit je a zobecnit a je tedy schopna samostatné vědecké práce.

Rád konstatuji, že disertační práci Ing. Kateřiny Novákové mohu doporučit k přijetí k obhajobě a dalšímu řízení.

V Praze, 15. 7. 2015

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
katedra analytické chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 88


Prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

UK v Praze
Přírodovědecká fakulta,
Katedra analytické chemie
Albertov 6, 128 43 Praha

Oponentský posudek disertační práce Ing. Kateřiny Novákové

„Studium transportu látek významných v životním prostředí přes biologické membrány a vývoj metod pro jejich stanovení“

Předložená disertační práce se zabývá přípravou a charakterizací modelových planárních fosfolipidových membrán s využitím metod elektrochemické impedanční spektroskopie a mikroskopických technik a studiem membránového transportu látek významných z hlediska procesů probíhajících v životním prostředí, především v rostlinách. Ke stanovení modelových látek autorka použila citlivé voltametrické metody s různými pracovními elektrodami.

Disertační práce obsahuje celkem 106 stran textu včetně seznamů zkratk a symbolů, obrázků (34), tabulek (2) a použité literatury (úctyhodných 220 odkazů na původní literární prameny a elektronické zdroje informací). Je doplněna seznamem publikační aktivity autorky a pěti přílohami publikací obsahujících stěžejní výsledky disertační práce.

Text přeložené práce je členěn klasickým způsobem. V teoretické části (sepsané na 30 stranách) autorka podává ucelený výklad o stavbě a funkcích biologických membrán a mechanismech transportu látek přes tyto buněčné bariéry. Přehledně a dostatečně podrobně se věnuje různým modelům biologických membrán, metodám jejich přípravy a diskutuje jejich výhody/nevýhody z hlediska využití pro studium transportu látek. Následující kapitoly 1.3 a 1.4 věnované látkám, jejichž transport přes modelové membrány autorka studovala v experimentální části práce, představují stručný a výstižný souhrn současných poznatků v této oblasti. Závěrečná kapitola 1.5 popisuje velmi stručně principy metod použitých v praktické části. V této části mohla autorka věnovat větší prostor přehledu využití těchto metod pro analýzu látek a charakterizaci objektů studovaných v disertační práci.

V experimentální části (10 stran) jsou uvedeny použité chemikálie a materiály, přístroje a pracovní postupy. Vlastní výsledky jsou shrnuty a diskutovány v kapitole 3 (20 stran). Za stěžejní lze považovat výsledky studia vlivu různých parametrů na stabilitu modelové planární membrány v pórech polykarbonátového nosiče a rovněž přípravu a charakterizaci modelů biomembrán obohacených o protoplasty či jejich složky izolované z rostlin ječmene. Zajímavé je zjištění zcela odlišných elektrických vlastností membrán obsahujících celé izolované protoplasty a membrán obohacených o hydrofobní složky extrahované z protoplastů. Dále jsou popisovány aplikace připravených modelových biomembrán ke sledování průchodu iontů Cd^{2+} , fytochelatinu a šřavelanu resp. jeho sloučenin s mědí. Zde bych chtěla upozornit na fakt, že rovnováhy v roztocích obsahujících měďnaté a šřavelanové ionty mohou být heterogenní v důsledku tvorby sraženiny Cu_2O_4 , jejíž vznik lze při použitých koncentracích iontů (0,01 mol/l) očekávat. K tomuto faktu je třeba přihlídnout při interpretaci experimentálních výsledků. Kapitola 3.6.2. věnovaná studiu komplexů mědi a lecitinu za použití MS s ionizací elektrosprejem je zařazena poněkud bez návaznosti na předchozí problematiku a poznatky v ní uvedené by mohly být více diskutovány v souvislosti se studiem přenosu či interakcí kovových iontů s modelovými membránami. Pro studium transportu Cd přes PLM by bylo rovněž účelné prozkoumat případnou tvorbu komplexů lecitinu s ionty Cd^{2+} .

Práce má dobrou jazykovou úroveň a nečetné chyby či překlepy v textu neovlivňují jeho srozumitelnost ani smysl a význam popisovaných poznatků.

K práci mám následující poznámky, komentáře a náměty k diskusi:

1. Sloveso detegovat (použité např. na str. 16 a dále v textu) je odvozeno z lat. detegere (objevit, odkrývat) a mělo by se proto psát s „g“ na rozdíl od podstatného jména detekce (je zde stejný vztah jako např. u slov reagovat – reakce).

2. V souvislosti s poslední větou Úvodu na str. 17 o tom, že je třeba mít „...dostatečně citlivé voltametrické metody, kterými by bylo možno přenášené látky správně a přesně kvantitativně a kvalitativně stanovit.“ je třeba upozornit na základní analytické pojmy: „stanovení“ používaný pro určování množství (kvantity) složek analyzovaného vzorku a „důkaz“ používaný v kvalitativní analýze. Z tohoto pohledu je uvedená část věty paskvil.
 3. Obr. 8 na str. 36 obsahuje značné množství zkratk nevyšvětlených ani v textu, ani v Seznamu zkratk a symbolů. Dále chybí vysvětlení zkratky MES použité v textu na str. 55.
 4. V legendě obrázků 9 a 10 na str. 38 by měl být uveden odkaz na literaturu, z níž byly obrázky převzaty.
 5. Na str. 46, 2. ř. by místo „téměř shodné píky“ mělo správně být „téměř shodné potenciály píků“.
 6. Str. 56, odst. 3, 1. ř.: Výraz „kadmiové ionty“ je nesprávný, neboť koncovka „-ový“ se v chemickém názvosloví používá pro prvky v oxidačním stupni VI.
 7. Na str. 48 v popisu proteinu TP10 je uveden řetězec 14 aminokyselin stejně jako u mastoparanu X. Je to v pořádku?
 8. Na str. 49 příp. dále v textu chybí podrobnější popis přípravy fosfolipidové membrány v ústí kapiláry v cele, jejíž schéma je na obr. 15. Mohla by autorka vysvětlit, jak byla membrána připravena a jaká byla její stabilita při relativně velkém průměru kapiláry v porovnání s velikostí pórů polykarbonátového nosiče?
 9. Obr. 22 na str. 63 má v legendě uveden „molární poměr lecitinu a cholesterolu“, kdežto v textu jsou uvedeny číselně stejné poměry, ale jako hmotnostní. Co je správně a jaký je rozdíl mezi molárním a hmotnostním poměrem těchto dvou látek?
 10. Legenda k obr. 25 na str. 66 je zřejmě neúplná.
 11. Legendy k tabulkám (str. 69 a 74) se obvykle uvádějí nad, nikoliv pod tabulkami.
 12. Kapitola 3.6.1: Pro použití analytických metod je důležité znát jejich parametry, jako jsou mez detekce, mez stanovitelnosti, příp. lineární rozsah a také možné interference. Byly metody DPAdSV s HMDE nebo s m-AgSAE použité pro stanovení PC₂ takto charakterizovány? Jaké jsou meze detekce použitých metod?
 13. Na str. 51, obr. 16 je uvedeno schéma EEC, který byl použit pro charakterizaci membrány v pórech polykarbonátového nosiče. Jak lze interpretovat jednotlivé prvky obvodu ve vztahu k použité elektrochemické cele a k modelu membrány?
- Celkově lze shrnout, že výsledky disertační práce ing. **Kateřiny Novákové**, převážně již publikované, přináší nové poznatky k aktuální problematice a mají významný aplikační dopad. Rozsah a zaměření práce, počet publikací i prezentací výsledků na konferencích svědčí o velmi dobré orientaci autorky v dané problematice a schopnosti samostatné vědecké práce. Práce splňuje požadavky kladené na doktorskou disertaci, a proto **doporučuji** její přijetí k obhajobě.

V Olomouci 10. 8. 2015



RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci
17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc