

Posudek na bakalářskou práci Markéty Svatákové

„Možností využití metod imunolokalizace ve skenovacím elektronovém mikroskopu s autoemisní tryskou“

Předložená bakalářská práce je napsána formou rešerše. Struktura rešerše je dobře vystavěná. Rešerše je členěna do 6 kapitol. V úvodu probírá celkem zasvěceně fyzikální základy elektronové mikroskopie. Další kapitoly se věnují přípravě vzorků pro SEM, imunoznačení a popisu parametrů ovlivňujících zobrazení v mikroskopu. Poslední kapitola je označena jako závěr. Literární přehled obsahuje řadu informací, které se vztahují k zadané problematice. Práce je však po formální stránce slabší. V textu jsou stylistické chyby a některé informace jsou nepřesné a neobratně vysvětlené. Předložené informace jsou méně přehledné a bez kritické analýzy. V textu autorka používá anglické termíny, například freeze etching a freeze drying, které lze nahradit.

Jako příklad nepřehledných informací uvádím tento zkrácený text ze strany 8, kapitola 2 s názvem „Skenovací elektronová mikroskopie, podkapitola 2.1. Fyzikální základy:

„Při nárazu elektronu na atom mohou nastat dva případy: elektron se buď odrazí (odchýlí) do jiného směru bez ztráty své původní rychlosti (energie), nebo část energie předá atomu a dále se pohybuje se zmenšenou kinetickou energií. V prvním případě se jedná o pružný rozptyl, ve druhém případě o rozptyl nepružný. Výsledkem interakce je některý se signálů....“. Autorka zjednodušila interakce mezi urychlenými elektrony a preparátem pouze na dva případy: pružný a nepružný rozptyl. Bez dalšího vysvětlení o interakcích mezi elektrony a hmotou, které jsou znázorněny na obrázku č.1, dále pokračuje pouze o sekundárních a odražených elektronech.

Mnoho nepřesných formulací je také v kapitole 2.1.2: Kryo-metody, strany 19-20. Autorka uvádí například:

„Vzorek.....se zmrazí v nativním stavu tekutým dusíkem nebo pomocí high pressure freezing“.

„...při fixaci tekutým dusíkem a HPF dochází k fixaci během milisekund, což je lepší než při chemické fixaci, která trvá sekundy až minuty“. Výhodou kryo-fixace je jistě její rychlost, nicméně rychlost mražení v milisekundách je nutná pro zamezení růstu krystalů, které by při mražení biologických preparátů vznikly a porušily by strukturu.

„Freeze etching je metoda prováděna z nízkého tlaku a vzorek se následně prohlíží ve zmrazeném stavu“.

Čtvrtá kapitola je věnována imunoznačení. Autorka dlouze popisuje pro tuto práci nepodstatné údaje o struktuře a tvorbě imunoglobulinů, zatímco princip metody imunolokalizace je zde uveden pouze v jediném odstavci a opět s mnoha nepřesnými formulacemi a neobratnostmi. Uvádím tyto příklady:

„metoda primárního značení“ místo metoda přímého značení;

„Dalšími markery pro TEM je např. křenuvá peroxidáza, tu však není možné pro skenovací mikroskopii použít.“ Zde ale slouží jaké marker elektrondenční produkt, který vzniká po přidání substrátu k enzymu.

„vazebnou rozmanitostí“ (o koloidních partikulích zlata).

Autorka popisuje pouze jeden, i když hlavní, princip imunolokalizace založený na vazbě sekundárních protilátek nebo proteinu A či G na Fc konce primárních protilátek. Existuje však celá řada dalších systémů, například použití systému biotin/avidin, DIG/ antiDIG, atd.

Podle mého názoru je nejméně podařená kapitola závěrečná. Autorka píše: „Zde uvádím, dva důkazy, které potvrzují výborné výsledky skenovacího elektronového mikroskopu s autoemisní tryskou. Jaké důkazy a výsledky má autorka na mysli? Autorka zde dále uvádí, že: „Kryo-FESEM je technika, která umožňuje 3D zobrazení buněčných ultrastruktury při velkém zvětšení“. Tento mikroskop však umožňuje pouze 2D zobrazení!

Autorka čerpala zejména z původní zahraniční literatury, učebnic a monografií. Svě informace čerpala také z internetových stránek. Bakalářská ani jiná vědecká práce by však neměly obsahovat citace z vlastních poznámek z přednášek (viz citace č. 21 a č. 24)

Cíle rešerše bylo stanoveny takto: „...nalézt v literatuře současné využití skenovacího elektronového mikroskopu s autoemisní tryskou pracujícího kryorežimu pro imunolokalizaci a zaměřit se na technické podmínky a přípravu biologických preparátů pro tuto metodu“. Tyto cíle byly splněny jen částečně. Přípravě preparátů je sice věnována jedna kapitola rešerše, jsou zde však popsány metody standardně používané pro sledování povrchů preparátů. Autorka v textu popisuje řadu kryometod (HRP, mrazové lámání a sušení). Není však uvedeno začlenění a výsledky metod, které se využívají pro imunoznačení preparátů pro SEM.

Dotazy a připomínky:

Citlivý YAG detektor upravený prof. Ing. Rudolfem Atratou, Drsc. (ne pouze panem Atratou!) je schopen odlišit zlaté partikule pokryté tenkou vrstvou platiny. Zde je rozdíl v atomových číslech pouze 1. Vliv urychlovacího napětí na znázornění zlatých partikulí je dobře popsán v kapitole 5.1.2.? Dovede vysvětlit proč urychlovací napětí ovlivňuje vizualizaci zlatých partikulí?

Autorka na straně 24 uvádí, že při imunolokalizaci v SEM není možné rozpoznat tvar markerů a je tudíž lepší používat částice koloidního zlata. Je toto tvrzení podloženo nějakou studií? Podle mého názoru není úplně správné a platí jen pro velmi malé částice.

Můžete uvést některé z používaných metod a výsledků imunoznačení pro SEM a porovnat výhody a nevýhody metod?

Bakalářská práce Markéty Svatákové shrnuje mnoho důležitých dosavadních poznatků o skenovacím elektronovém mikroskopu, jeho parametrech a možnostech detekce zlatých partikulí. Práce navazuje na problematiku, která je v současnosti řešena v Laboratoři elektronové mikroskopie Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. Bakalářská diplomová práce Markéty Svatákové splňuje požadavky kladené na tento typ prací a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 22.5. 2009

RNDr. Marie Vancová, Ph.D.

