

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Hany Bielnikové:

„Možnosti využití nízkonapěťového elektronového mikroskopu LVEM5 k identifikaci virů“.

Bc. Hana Bielniková se ve své diplomové práci zaměřila na čtyři oblasti, jejichž řešení dovolilo otestovat vhodnost nízkonapěťového elektronového mikroskopu LVEM5 k zobrazení virových agens pro účely rychlé diagnostiky v lékařské biologii.

První řešenou oblastí byl výběr vhodných typů virů, které by splňovaly požadavky na jejich různý tvar, velikost i morfologické charakteristiky. Vybrány byly čtyři rostlinné viry (virus tabákové mozaiky, tabákové nekrózy a mozaikový virus jetele) a jeden živočišný (virus klíšťové encefalidity). Bohužel se nepodařilo získat všechny suspenze dostatečně purifikované s optimální koncentrací virových částic, a to ani po následné centrifugaci, zejména u viru tabákové nekrózy a klíšťové encefalidity. Skutečnost, že tyto dva viry nebylo možno pozorovat v elektronovém mikroskopu (LVEM5) při nízkém napětí, ale pouze po kontrastování, při použití vysokého napětí (TEM), ukázala důležitost optimální koncentrace viru pro jeho identifikaci v analyzovaném vzorku mikroskopem LVEM5.

Otázka: Proč autorka práce nepoužila k purifikaci a zkoncentrování vzorků některý typ gradientové centrifugace, eventuálně některý přístroj pro zahušťování? Podle mého názoru je vhodné při jakémkoliv testování vycházet z dobře definovaného materiálu.

Druhou oblastí byla modifikace metody negativního barvení pro pozorování virových preparátů pomocí LVEM5. Byla testována čtyři negativní barviva o třech různých koncentracích. Byly porovnány výsledky dvou vybraných metodických přístupů a to dvoustupňové sukcesivní kapací techniky a techniky plovací. Výsledky ukázaly plovací techniku jako vhodnější pro virové preparáty, které nejsou vysoce purifikované, neboť při tomto přístupu dochází k daleko nižší adsorpci nežádoucích látek ze vzorku na EM sítku. Navíc u dostatečně koncentrovaného preparátu viru tabákové mozaiky byla touto technikou prokázána rovnoměrnější distribuce virových částic. Naopak dvoustupňová sukcesivní kapací technika se ukázala vhodná při analýze vysoce purifikovaných optimálně koncentrovaných virových suspenzí. Velmi zajímavý výsledek představuje zjištění, že použitá negativní barviva nepřispívají výrazně ke zvýšení kontrastu obrazu v nízkonapěťovém EM, a že kontrast virových částic je v tomto EM srovnatelný s částicemi nebarvenými.

Otázka: Jaké je vysvětlení skutečnosti, že na zvýšení počtu adsorbovaných částic viru tabákové nekrózy ani klíšťové encefalidity neměla vliv ani použitá technika, ani delší časy adsorpce na EM sítku? Bude-li pokračováno v tomto metodickém výzkumu, uvažuje autorka o použití techniky negativního barvení molybdenanem amonným v přítomnosti trehalosy, která je vhodná zejména pro delší tubulární struktury (Harris J.R. Micron 2008)?

Třetí oblast byla věnována přípravě a ověření povrchových vlastností podložních uhlíkových membrán. Byla zjištěna výhoda nepřímého napaření uhlíkové vrstvy, neboť tyto membrány vykazovaly daleko větší homogenitu, což je důležité pro studium

mikromorfologických vlastností analyzovaných objektů. Autorka dále zjistila klesající hydrofilitu uhlíkového filmu v závislosti na čase. Působením doutnavého výboje docházelo k časově omezenému obnovení hydrofility. Tyto výsledky jsou důležité pro zachycení optimálního počtu virových částic na podložní film a zároveň pro homogenní rozprostření těchto částic.

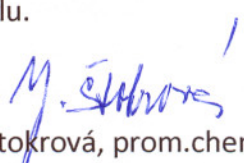
Poznámka a otázka: Z většiny literárních údajů i souborných publikací (*Electron microscopy in molecular biology Eds.J.Sommerville and U.Scheer 1987*), ale i ze zkušenosti v naší laboratoři je patrné, že čerstvě připravený uhlíkový film je do vysoké míry hydrofobní a tudíž je nutný nějaký druh aktivace. Nejlepší se ukazuje právě doutnavý výboj, který preparát co nejméně kontaminuje. Čím si autorka vysvětluje hydrofilitu čerstvě připraveného uhlíkového filmu v experimentech uvedených v práci?

Ve **čtvrté** oblasti autorka porovnává výsledky získané v elektronovém mikroskopu, který pracuje s nízkým urychlovacím napětím (LVEM5) s výsledky, získanými ve vysokonapětovém transmisním elektronovém mikroskopu (HV TEM). Srovnání neprokázalo žádné výrazné strukturální odlišnosti analyzovaného modelového preparátu viru. Za významný považují výsledek, týkající se vysokého kontrastu virových částic v LVEM5 i bez použití jakéhokoliv typu kontrastování, které může negativně ovlivňovat strukturu pozorovaného biologického objektu.

Závěrem je možno konstatovat, že Bc. Hana Bielniková splnila všechny cíle vytčené v magisterské práci a získala řadu důležitých i zajímavých poznatků. Prokázala použitelnost nízkonapětového elektronového mikroskopu LVEM5 pro rychlou analýzu vzorků virových suspenzí bez nutnosti použití kontrastujících agens, které mohou být zdrojem artefaktů. V neposlední řadě je nutno zdůraznit, že zvládla složité a časově náročné elektronmikroskopické techniky, zejména práci s mikroskopem LVEM5, vyžadující značnou erudici. Na získané výsledky mohou navázat pracoviště, zabývající se diagnostickými metodami.

Proto souhlasím s udělením magisterského titulu.

V Praze 21.ledna 2009


Jitka Štokrová, prom.chem., CSc.

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, odd. virových a mikrobiálních proteinů,
Flemingovo nám 2, 166 10, Praha 6

Přírodovědecká fakulta UK, Katedra genetiky a mikrobiologie, Viničná 5, 128 44, Praha 2

Hana Bielniková: Možnosti využití nízkonapětového transmisního elektronového mikroskopu LVEM 5 k identifikaci virů

(69 stran textu, 89 citací, 19 obrázků v textu, 17 obrázků v příloze, 2 grafy)

Předložená práce se zabývá identifikací virů ve speciálním elektronovém mikroskopu LVEM 5. Na tomto místě je nutné si uvědomit, že tento mikroskop je- na rozdíl od elektronových mikroskopů konvenčních, které naleznete v celé řadě laboratoří po celém světě- velmi málo rozšířený. Jedná se stále o v jistém slova smyslu novinku. Rozšířen je tedy velmi málo a také znalostí o něm a především o možnostech jeho využití není mnoho. Z tohoto úhlu je jakákoliv vědecká práce na tomto typu mikroskopu svým způsobem průkopnickou prací. S tímto mikroskopem není lehké pracovat ani pro zkušeného odborníka. Cením si, že na něm odvedla kus práce magisterská studentka.

Na začátku k formální úpravě práce- autorka zde dobře a logicky rozčlenila jednotlivé části a podčásti celé práce. Domnívám se ale, že není šikovné, aby obrázky úvodní části měly samostatné číslování a výsledková část také. A navíc- příloha také. Může pak dojít k chybě při odkazu na určitý obrázek- je zde trojí číslování.

Úvodní část nás velmi komplexně na 29 stranách uvádí do problematiky. Pokud se na tuto úvodní část podíváme z hlediska literárního přehledu, pak zde autorka dobře zachytila a zhodnotila existující literaturu. Problematika je systematicky a podrobně rozčleněna a uvedena.

Kapitola "Materiál a metody" velmi podrobně a přesně popisuje na 10 stránkách (relativně hodně) použité všechny mikroskopické metody a práci s viry. Hodnotím pozitivně (a to se týká i metodické části v úvodu), že autorka uvádí u jednotlivých technika i jejich potenciálně „slabší“ stránky.

Kapitola „Cíle práce“ nastiňuje ve 4 bodech to, co by mělo být předmětem vlastního výzkumu. Studentka zde stručně ale dostatečně formuluje úkoly práce.

Kapitola "Výsledky" na 4 stranách popisuje výsledky strukturálních studií. Navazuje na ní 17 obrázků v příloze a 2 grafy.

Kapitola "Diskuse" má 8 stran. Všechny zjištěné skutečnosti jsou zde diskutovány a zasazeny do rámce tohoto oboru. Pak už následuje jen stručné závěry práce.

Musím konstatovat, že jsem v práci nenašel takové podstatné chyby a nepřesnosti, které by zásadně snižovaly úroveň práce. Přesto bych chtěl upozornit na některé významnější skutečnosti:

Na více místech používá autorka termín „vysokonapětový elektronový mikroskop” jako protiváhu k studovanému „nízkonapětovému elektronovému mikroskopu”. Domnívám se, že by chtělo používat přesnější označení- například „100 kV elektronový mikroskop” místo „vysokonapětový elektronový mikroskop”. On ten v práci uváděný 100 kV TEM mikroskop tak úplně „vysokonapětový” není. V konvenčních elektronových mikroskopech jsou totiž modely používající urychlovací napětí 300 kV a ty už lze do kategorie „vysokonapětových elektronových mikroskopů” zařadit. A pak jsou další modely používající urychlovací napětí 1000 kV a více. Upřesněním se situace zprůhlední.

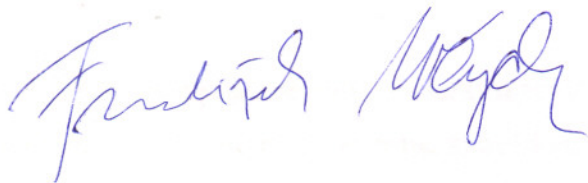
Znovu musím konstatovat to, co jsem už připomněl v úvodní části posudku: Tento mikroskop je u nás i ve světě velmi málo rozšířený a také znalostí o něm a především o možnostech jeho využití je málo. S tímto mikroskopem není lehké pracovat ani pro zkušeného odborníka a tak oceňuji, že na něm Hana Bielniková jako magisterská studentka odvedla kus práce. Přesto si myslím, že svůj dlouhodobý výzkum zpracovala v předložené práci skromněji, než by určitě na základě svých výsledků mohla. Týká se to i obrazové části. Ve srovnání s průkopnickým rázem celé magisterské práce to neuvádím jako výtku zásadní, ale doporučuji pro publikaci, o kterou si toto téma říká, některé výsledkové partie doplnit.

V práci se- a nemůže to být jinak- vyskytují řídké překlepy a jiné drobné formální nepřesnosti. V této práci je jich skutečně minimálně, ale některé jsou nepřehlédnutelné. Například profesora Delonga není na místě si plést s panem Delonem, odborníkem v jiném oboru. Protože takových formálních chyb je minimum, nesnižují vůbec úroveň předložené práce.

Závěr

V celkovém hodnocení předložené magisterské práce mohu konstatovat, že Hana Bielniková problematiku zvládla a splnila všechna kritéria PpF JU na magisterskou práci. Studentka zde prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Práci doporučuji po doplnění opublikovat v některém z vědeckých časopisů.

Práci Hany Bielnikové: Možnosti využití nízkonapětového transmisního elektronového mikroskopu LVEM 5 k identifikaci virů" doporučuji přijmout jako magisterskou diplomovou práci.



Doc.RNDr.František Weyda,CSc.

Biologické centrum AV ČR (Entomologický ústav) a Přírodovědecká fakulta JČU

České Budějovice, 23. ledna 2009