

**Veronika Eiblová: Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro imunoznačení ve skenovacím elektronovém mikroskopu s autoemisní tryskou**

(73 stran textu, 78 citací, 23 obrázků v textu, 26 obrazových příloh, 3 grafy, 10 tabulek)

Předložená magisterská diplomová práce se zabývá částí elektronové mikroskopie založené na aplikacích v mikroskopu FESEM (field emission scanning electron microscope), což je vysoko-rozlišovací skenovací elektronový mikroskop, který používá jako zdroj elektronů autoemisní katodu. Navíc s ním lze pracovat ve zmrazovacím módu. Tento mikroskop se v posledních letech hodně rozšířil, přesto stále nepatří k běžným vybavením laboratoří elektronové mikroskopie. A Veronika Eiblová hledala nové kovové markery právě pro tento mikroskop. Takové markery se pak snažila navázat na protilátku a s ní provést imunolokalizaci na vhodném modelovém systému. Zde je třeba si uvědomit, že zabývat se hledáním nových kovových markerů je práce poněkud novátorská.

Úvodní část nás na 20 stranách uvádí do problematiky. Začíná popisem elektronového mikroskopu FESEM JEOL JSM-740 a dokladuje to, co zde ovlivňuje tvorbu obrazu (nevyhýbá se ani problematice nabíjením vzorků a tvorbou artefaktů). Velmi podrobně se zabývá imunolokalizací, přípravou preparátů pro FESEM, vlastnostmi nanočástic a konjugacemi.

Jako cíle práce si Veronika Eiblová dává: provést literární rešerši k zadané problematice, zvládnout teoretické i experimentální základy práce se skenovacím elektronovým mikroskopem s autoemisní tryskou, vytipovat kovové nanočástice, které budou využitelné jako markery pro imunoznačení, navrhnout a vyzkoušet postup konjugace vhodných nanočástic s protilátkou a na vhodném modelovém systému provést s připravenou značenou protilátkou imunolokalizaci.

Kapitola "Materiál a metody" přesně popisuje vyčerpávajícím způsobem na 15 stránkách (relativně hodně) všechny použité techniky práce s nanočásticemi včetně jejich výběru a vlivu pokovení na jejich detekci, problematiku imunozlacení nanočástic a další.



Kapitola "Výsledky" na 8 stranách popisuje v návaznosti na předchozí kapitolu o použitých metodikách výsledky výběru vhodných nanočástic a vliv pokovení na jejich detekci, pozorování v TEM a FESEM, problematiku konjugace, jednoduché a dvojité imunoznačení na ultratenkých řezech a dvojité imunoznačení.

Kapitola „Diskuze“ rozebírá na 5 stranách zjištěné skutečnosti a zasazuje je do rámce oboru. Pak už následuje jen stručné závěry práce.

Musím konstatovat, že jsem v práci nenašel tak závažné chyby, které by zásadně snižovaly úroveň práce. Přesto bych chtěl upozornit na některé vybrané nepřesnosti a diskutabilní skutečnosti:

1) Z cílů práce bylo některých dosaženo. Pokud se například týče vytipovaných kovových nanočástic, které jsou využitelné jako markery pro imunoznačení, pak pro imunoznačení ve FESEM jsou nejvhodnější nanočástice zlata a palladia. Údaje o délce pokování vzorků nanočástic Au10 platinou a uhlíkem jsou také přínosem. Veronika Eiblová dospěla k závěru (pokud jde o rozlišení nanočástic z jiných kovů pomocí BSE zobrazení), že rozlišení nanočástic Au10 a Pd10 v TEM i FESEM se nepodařilo prokázat. Odkazuje přitom na snímky v příloze 7. a 8. Souhlasím s hodnocením situace u přílohy 8. U přílohy 7 si nejsem zcela jistá a možná by stálo provést sofistikovanější obrazovou analýzu třeba s adaptivními filtry, dekonvolucí a podobně.

2) Některé v práci použité imunometody nevyšly podle předpokladu. Jedno ze zdůvodnění částečných neúspěchů: „To mohlo být dáno špatným seřazením mikroskopu, popřípadě nabíjením vzorku“ ukazuje, že v práci studentky byly určité rezervy, které chtělo dotáhnout. Vždyť sama posléze konstatuje: „Práci s nanočásticemi bychom mohli přirovnat k běhu na dlouhou trať, neboť je to práce nelehká, která vyžaduje čas a trpělivost. Je to však cesta schůdná, na které je nutné dále pracovat“.

3) V práci se vyskytuje sice formální, ale docela závažný nedostatek (možná se zde už objevuje posun k internetové civilizaci, kde si řadu informací najdeme na webu a respekt ke klasickým zdrojům už se snižuje): Řada citací v Seznamu použité literatury neodpovídá vžitému a de facto závaznému standardu (chybí ročník, stránky atd.).

4) Měl bych jednu osobní výhradu, byť se nejedná o nic zásadního: Například obrázek 13 je převzat z literatury. Zdroj je sice uveden, domnívám se ale, že v tomto typu práce není šťastné

cizí obrázky takto přebírat, jisté originalnosti by víc svědčilo obrázky samostatně nakreslit  
Nechám k úvaze.

5) V úvahách o historii elektronové mikroskopie nezapomenout na to, že prototyp elektronového mikroskopu v roce 1931 zhotovil kromě Maxe Knolla i Ernest Ruska, na kterého Veronika Eiblová na str.1 zapomněla.

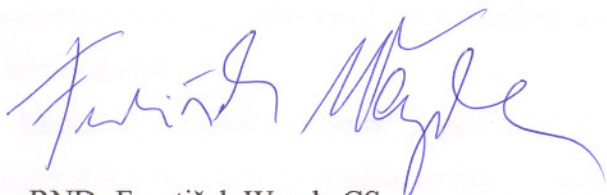
6) Autorka ve snaze zachovat kompletní postup přípravy preparátů pro FESEM podle H. Schattena zahrnula i stupeň „Očištění“ (cituji: „...povrch preparátu se nejdříve očistí, aby nezbavil nežádoucích nečistot. Větších nečistot je možné se zbavit pomocí jehly. Menší nečistoty se odstraní roztokem HCl nebo NaCl“). Tento stupeň pro menší nečistoty jistě nebude zařazen v případě přípravy tkáně pro imunoelektronovou mikroskopii, že?

7) Příloha 5 a 6- dvě desetinná místa v případě nanometrů jsou zbytečná.

#### **Závěr**

V celkovém hodnocení předložené magisterské práce mohu konstatovat, že Veronika Eiblová problematiku zvládla a splnila všechna kritéria PŘF JU na magisterskou práci. Studentka zde prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Práci doporučuji po důkladnějším doplnění (resp.dopracování) opublikovat v některém z vědeckých časopisů jako “short note”.

**Práci Veroniky Eiblové: „Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro imunoznačení ve skenovacím elektronovém mikroskopu s autoemisní tryskou“ doporučuji přijmout jako magisterskou diplomovou práci.**



Doc.RNDr.František Weyda,CSc.

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

(katedra medicínské biologie)

České Budějovice, 16. května 2011



## Posudek na diplomovou práci

### **Veronika Eiblová: Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro imunozačnění ve skenovacím elektronovém mikroskopu s autoemisní tryskou**

Diplomová práce je zaměřena na řešení aktuálního problému značení biologických vzorků koloidními nanočásticemi kovů pro vyšetřování vzorků elektronovou mikroskopií. Cílem práce je navrhnout a ověřit použití dalších typů kovových nanočástic jako alternativu k dnes nejčastěji používanému koloidnímu zlatu.

V teoretické části diplomantka pojednává o základech skenovací elektronové mikroskopie, imunochemie a nanočásticích. Očekávala bych hlubší zaměření na řešenou problematiku, tato část působí spíše jako shrnutí základních středoškolských znalostí. V biochemické části se objevuje neobratné a nepřesné vyjadřování a chyby z nepozornosti a zejména v metodické a výsledkové části je obtížné se orientovat.

K práci je možné mít celou řadu připomínek nebo dotazů, z nichž bych uvedla alespoň následující:

V Tabulce č. 1 diplomantka jistě nechtěla říci, že avidin, streptavidin nebo protein A jsou protilátky nebo že se streptavidin váže na avidin.

Jakým způsobem byly nanočástice Ag a Pd použité v práci stabilizované nebo povrchově modifikované?

Pro přípravu biokonjugátů byla použita vlastní metodika nebo převzatá z literatury? Publikovaný postup by bylo vhodné citovat.

Co je přesně míněno vyjádřením nestabilita Ag a Pt nanočástic ve FESEM?

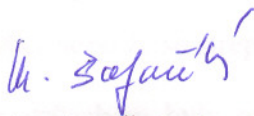
Proč se změřené koncentrace navázaného proteinu (uvedené v Tabulce 10) u kovalentně navázané Pt a Pd od sebe výrazně liší? Co znamenají hodnoty „koncentrace navázaného proteinu“? Z metodické části se zdá, že se jedná o konjugovaný protein, avšak z diskuse spíše vyplývá že jde o zbytkovou koncentraci proteinu v roztoku.

V kap. 4.6.2.2. Materiál je uveden streptavidin (místo proteinu A?) pro konjugaci. Pokud byla skutečně provedena konjugace s proteinem A, proč nejsou v práci uvedené výsledky?

Odborná literatura se zdá být použita odpovídajícím způsobem, avšak citace jsou řazeny chaoticky. Podobně styl psaní citací v Seznamu použité literatury je značně nestandardní a v této podobě je velmi obtížné citovanou práci dohledat.

Celkově je možno konstatovat, že zvolené téma diplomové práce je zajímavé a testování nových typů nanočástic jako markerů pro elektronovou mikroskopii je žádoucí. Příprava biokonjugátů skutečně není triviální záležitostí a i z výsledků předložené práce je zřejmé, že metodiku bude třeba dále ještě optimalizovat. Část práce týkající se elektronové mikroskopie nejsem schopná dostatečně kvalifikovaně posoudit, nicméně bych řekla, že diplomantka odvedla požadovanou práci a získala výsledky, které dávají podklad pro obhajobu diplomové práce.

Diplomovou práci klasifikuji známkou „dobře“ a doporučuji k obhajobě.



Ing. Miroslava Šafaříková, Ph.D.

Ústav nanobiologie a strukturní biologie CVGZ AV ČR, v.v.i.

České Budějovice

V Českých Budějovicích, 17. 5. 2011