



Laboratory of Electron Microscopy, *Faculty of Science,*  
**CHARLES UNIVERSITY**

Viničná 7  
CZ-128 40 Prague 2  
Czech Republic

tel. ++420221951942-4, fax ++420224919704

e-mail [lem@natur.cuni.cz](mailto:lem@natur.cuni.cz)

<http://web.natur.cuni.cz/~lem>

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Elišky Korandové „Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro imunoznačení v nízkonapěťovém elektronovém mikroskopu“

Předložená diplomová práce se zabývá aktuálním tématem použití nanočástic pro aplikace imunoznačení a obecně detekce v systému relativně málo známé nízkonapěťové elektronové mikroskopie (LVTEM). Autorka testovala několik nanočástic různého chemického složení z hlediska jejich možného standardizovaného zobrazení v mikroskopech Delong LVEM 5 a TEM Jeol JEM-1010 a zkusila jednu z nich použít pro imunoznačení glykanů na řezech slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*. Výsledkem experimentální části je zjištění, že LVEM 5 (LVTEM) je použitelný pro vizualizaci nanočástic od velikosti 5 nm výše; z hlediska chování pod elektronovým svazkem v uvedeném mikroskopu se jako nejvhodnější jeví nanočástice zlata a paladia, ale výrazným omezením pro jejich praktické využití pro účely imunoznačení v LVTEM je požadavek velmi tenkých, cca 20 nm silných řezů.

Diplomová práce je psaná v češtině, má 74 stran, 8 kapitol, 61 citací a je součástí řešení širšího projektu „Nové nanočástice pro ultrastrukturální diagnostiku“ (KAN200520704).

Přestože je téma diplomové práce velmi zajímavé a vytýčené cíle i pestrost použitých metod nabízí ucelené a vyčerpávající zpracování se zájmem a hlubší účastí řešitele, nemůže se oponent po přečtení předkládané práce ubránit dojmu, že jak po obsahové, tak po formální stránce mohla autorka do výsledného zpracování vložit více času, energie a práce. Ačkoli je v úvodu (Obsah) podána celkem logicky osnova se základním rozvržením kapitol, autorka se jí drží jen z části, míchá a opakuje cíle a postup práce, výsledky s diskuzí a obecná či literární zjištění (bez citace) se svými závěry. I v rámci řady jednotlivých podkapitol čtenář ztrácí jednotnou myšlenku a text i jeho sdělení má syrový neuspořádaný charakter stylisticky i obsahově. V mnoha místech jako by autorka text převzala či nevhodně přeložila, aniž si výslednou českou větu zpětně přečetla a registrovala její obsah. Kapitoly v teoretické části jsou nerovnoměrně (podle mého soudu některé i nedostatečně) zpracovány. Naopak v postupech práce je autorka zbytečně rozvláčná a detailně popisuje i základní obecně známé postupy, které by šly uvést formou protokolu. V práci se objevují i terminologické chyby, části cizího textu bez označení o citaci autora a typografické chyby. Z výše uváděných nedostatků uvádím a dokumentuji (autorce) v následujícím seznamu ty nejzásadnější:

- sjednocení či jasné rozlišení termínů LVEM 5 a LVTEM 5 v celé práci (např. str.1 vs. 44-74)
- důvod uvádění atomového čísla u uranu a olova (str. 9) když u ostatních prvků/kovů chybí?

- „elektronové čočky z permanentních magnetů nemohou být realizovány jako jednoduché čočky.....“ (str.13) správný termín je elektromagnetické čočky; realizovány-česká stylistika?
- YAG (str. 14) dle chem. názvosloví nikoli yttrium-hlinitý ale yttrito-hlinitý granát
- str.15 a 16 celé věty jsou doslovně či se záměnou 1 slova převzaty (včetně pořadí slov) z textu e-skript školitelky Ing. Jany Nebesářové, CSc. „Elektronová mikroskopie pro biology“  
<http://www.paru.cas.cz/lem/book/>
- „elektrony na orbitách atomů“ – správný termín orbitalech; termíny orbita a orbital mají jiný význam
- str. 17 izolovaných, str.18 hydrofilii
- str. 21 „Imunolokalizace je metoda, která umožňuje lokalizovat antigeny na elektronmikroskopické úrovni....“ – netýká se výlučně ELMI úrovně
- str.26 „Užitečný startovní bod je vybrat protein, aby jeho pH se blížilo izoelektrickému bodu“ - nepřesná a zavádějící formulace
- str. 27 „Je založena na pevných kovalentních silách mezi ...“ - vazbách
- str. 30 „Postup práce:detekovat, vyhodnotit vybrat...“ - terminologie cílů práce
- „podrobný popis syntéz studovaných nanočástic je uveden v podaných přihláškách vynálezů a užitných vzorů“ – z uvedených informačních zdrojů je nelze dohledat, nelze doplnit přesnější odkaz?
- str. 33 QD, borátovém – typografické chyby
- str. 39 „Těmito fotografiemi byl potvrzen rozdíl mezi nimi (obr. 18 a obr.19) – tento závěr byl učiněn na základě jen těchto 2 fotografií nebo jich bylo více? Blány jsou konstatně takto rozdílné při použití první nebo druhé metody napařování nebo se kvalita mění ještě s dalšími faktory?
- str. 39,41,67 3x opakovaná informace že klíště sálo 72h bez vysvětlení důvodu
- str.30,40 – „...bylo zpracováno pomocí moderní nízkoteplotní techniky (PLT) s použitím zařízení EM CFD...“ – špatný překlad progressive (postupné! ne moderní) lowering of temperature , v podobných případech je lépe uvádět i anglický název, totéž u EM CFD (cryosorption freeze drying)
- str.44 obsah a stylistika neodpovídá kapitole výsledky ale spíš cíle, někde metody.
- obr.29 str. 54 v tištěné kopii není vidět kde objekty jsou, šipka?
- str. 55 – oxidu kobaltičitého - dle chem. názvosloví správně oxidu kobaltnato-kobaltitého
- str. 57 totožná informace opakovaná v teoretické části

- str.57-64 „s největší pravděpodobností je to způsobeno“, „také je o něm dobře známo (bez citace)“ informace/formulace patří do diskuse

- str.68 „jak dokázal profesor Delong i Nebesářová a kol. ve svých pracech – chybí odkazy/citace

Diplomová práce má ukázat připravenost autora na vědeckou práci: hlubší obeznámení se stavem problematiky, přesné formulování cílů a jasné stanovení nejvhodnějších metodických postupů, dostatečnou dokumentaci a věrohodné zpracování dat a seznámení s výsledky vlastních experimentů formou ustálených publikačních postupů spolu s konfrontací s výsledky jiných autorů.

Předložená práce sice přináší nová a zajímavá zjištění, autorka zvládla řadu metodických postupů a v problematice se jistě i orientuje, přesto zpracování, které Bc. Eliška Korandová ve své diplomové práci předložila, splňuje jen základní nároky kladené na diplomovou práci. Doporučuji, aby byla přijata, ale hodnotím ji pouze stupněm dobře.

Praha 16.5. 2011

Mgr. Miroslav Hyliš, Ph.D.  
Laboratoř elektronové mikroskopie biologické sekce PŘF UK Praha

**Eliška Korandová: Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro imunozačnění v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu**

(74 stran textu, 61 citací, 39 obrázků v textu, 6 histogramů, 8 tabulek)

Předložená práce se zabývá využitím nanočástic ve speciálním nízkonapětovém 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. Tento mikroskop je ale nejen málo rozšířen, ale také znalostí o něm a především o možnostech jeho využití není mnoho. Nazíráno z tohoto úhlu je jakákoliv vědecká práce na tomto typu mikroskopu svým způsobem průkopnickou prací. Vzhledem k tomu, že pracovat s tímto mikroskopem není lehké ani pro zkušeného odborníka, oceňuji, že na něm odvedla kus práce magisterská studentka.

Eliška Korandová nás v úvodní části komplexně na 29 stranách uvádí do celé problematiky. Cíle práce si autorka- vzhledem k málo probádané problematice- dala dosti vysoké.

Kapitola nazvaná „Experimentální část“ má jen jeden oddíl s názvem „Postup práce“. Zde autorka upřesňuje cíle celé práce. Domnívám se, že tato část mohla být integrována do „Úvodu a cíle práce“.

Kapitola "Materiál a metody" velmi podrobně popisuje na 12 stránkách (relativně hodně) všechny použité metody jak co se týká elektronových mikroskopů, tak přípravy řezů a nakonec i imunozačnění.

V kapitolách "Výsledky" (na 20 stranách včetně obrázků, tabulek a histogramů) a „Diskuse“ (5 stran) Eliška Korandová předkládá a komentuje nejen to, čeho se jí podařilo v diplomové práci dosáhnout, ale i to, co se nepodařilo. Tady se projevila úskalí neprošlapaných cestiček této novátorské techniky. Pak už následují jen stručné závěry práce.

Musím konstatovat, že styl psaní i přes snahu autorky není zcela koncizní. Chtěl bych upozornit na některé vybrané mírně problematické skutečnosti (nebo formulace), formální i faktické:

1) Na stránce 3 je třeba formulace: „Kvůli elektrondenznímu charakteru jsou kovové nanočástice snadno rozpoznatelné v transmisním elektronovém mikroskopu a jsou tedy ideální značkou (markerem) při imunolokalizaci buněčných komponent...“. To je jen jedna část pravdy, druhou je naprosto charakteristický tvar partikulí.

2) Autorka nám například na str.4 sděluje: “V současné době pracnost přípravy preparátů, finanční náročnost této techniky s bouřlivě se rozvíjejícími metodami buněčné biologie vedla k určitému odchodu od metod transmisní elektronové mikroskopie. Vývoj však stále pokračuje, hledají se nové typy mikroskopů, mezi kterými je nízkonapětový elektronový mikroskop“. Zmiňuji tento odstavec proto, že se týká obecně vývoje elektronové mikroskopie. Ačkoliv předpokládám, co asi chtěla autorka říci, celá formulace není z nešťastnějších.

3) Chci se zde dotknout jedné možná diskutabilní věci. Například obrázky 9 a 10 jsou převzaty z literatury. Zdroj je sice uveden, domnívám se ale, že v tomto typu práce není šťastné cizí obrázky takto přebírat, jisté originálnosti by víc svědčilo obrázky nakreslit. Je to ale jen můj dojem, nejde o zcela zásadní věc.

4) Chtěl bych zmínit ještě jednu nešťastnou, byť obecnou formulaci ze stránky 65: “ Ve 21. století, kdy člověk udělal mnoho významných pokroků v oblasti biologie, medicíny a diagnostické techniky, se nabízí otázka, zda se v některých odvětvích dá dostat ještě někam dál. Před lety tato otázka vyvstala právě pro elektronovou mikroskopii, která se zdála být zmírajícím oborem, který už všechny své potenciály a možnosti vyčerpal. Časem se však ukázalo, že zatracovat elektronovou mikroskopii je předčasné. Technický a materiální pokrok umožnil dále zdokonalovat elektronové mikroskopy po konstrukční a funkční stránce. Také nové metodiky přípravy vzorků dovolily elektronové mikroskopii posunout se zase o něco dál...“. Pokrok mikroskopických metod v 21.století byl sice nerovnoměrný, ale o nějaké stagnaci se těžko dá mluvit. Nešťastných formulací tohoto typu je v práci více (například na str.68 i jinde).

5) Chtěl bych upozornit sice na formální, ale docela závažný nedostatek: Řada citací v Seznamu použité literatury neodpovídá vžitému a de facto závaznému standardu (chybí ročník, stránky atd.).

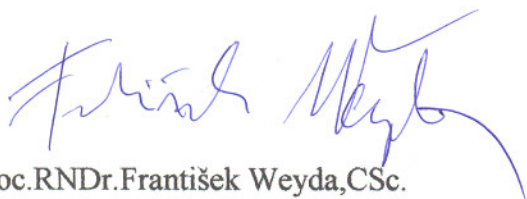
V úvodu posudku jsem zmínil, že si Eliška Korandová dala cíle své práce- vzhledem k málo probádané problematice- dosti vysoké. Celkový dojem z práce mi říká, že se vše

nepodařilo uspokojivě vyřešit a ideálně sepsat. Na tomto místě ale musím znovu konstatovat to, co jsem už připomněl v úvodní části posudku a to, že 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 Eliška Korandová jako magisterská studentka svůj kus práce odvedla. Vždyť zavádění nových markerů do imunoelektronové mikroskopie je věc nesmírně aktuální a perspektivní. Pokud by se na problematice ještě zapracovalo (poněkud více), pak by stálo opublikovat alespoň pár údajů ve formě "short note" v některém z vědeckých časopisů. A rozhodně by stálo zato ve výzkumu pokračovat.

### **Závěr**

V celkovém hodnocení předložené magisterské práce mohu konstatovat, že Eliška Korandová problematiku zvládla a splnila všechna kritéria PřF JU na magisterskou práci. Studentka zde prokázala schopnost samostatné vědecké práce i na obtížné tématice.

**Práci Elišky Korandové: „Možnosti využití nanočástic různých kovů jako markerů pro imunoznačení v nízkonapětovém elektronovém mikroskopu“ 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