

Posudek na magisterskou diplomovou práci Denisy Martykánové „Nové nanočástice v ultrastrukturální diagnostice“

Kovové nanočástice jsou v současné době v popředí zájmu mnoha vědních oborů. Jejich uplatnění je velmi široké. Předkládaná diplomová práce se věnuje možnosti využití palladiových nanočástic jako značek pro lokalizaci antigenů v elektronových mikroskopech. Práce navazuje na výsledky, které byly v Laboratoři elektronové mikroskopie PaÚ BC AV ČR dosaženy v nedávné době, a dále tuto problematiku rozpracovává. Magisterská diplomová práce má celkem 56 stran včetně literatury, 28 tabulek, 22 obrázků. Cílem práce bylo provést literární rešerši, otestovat stabilitu nanočástic pod elektronovým svazkem, zjistit variabilitu průměrů nanočástic, pokusit se o konjugaci proteinů a nanočástic a získané konjugáty použít pro imunolokalizaci.

První část diplomové práce je literární přehled. Na 11 stranách se autorka věnuje velmi stručně principům imunolokalizace a definuje základní pojmy, popisuje velmi obecně a stroze principy zobrazování objektů v elektronových mikroskopech. Rozhodně tuto část nelze považovat za vyčerpávající literární rešerši k dané problematice, protože chybí řada poznatků o vlastnostech dalších kovových nanočástic, jejich stabilizaci a způsobech konjugace, využití pro detekci v elektronových mikroskopech. Pouze 1/2 strany textu je věnována vazbě proteinu a nanočástic.

Kapitola „Materiál a metody“ obsahuje řadu protokolů. Postupy statistického vyhodnocení měření průměrů nanočástic a účinnosti detekce získaných konjugátů při imunolokalizaci jsou uvedeny až v kapitole výsledky. Chybí některé důležité údaje o protilátce, která byla použita pro lokalizaci BSA na řezech (třída imunoglobulinu, koncentrace protilátky). Chybí postup kontrolního značení. Složení pufru PBS, jak je uvedeno, není správné. Není uvedeno složení 0.1 M fosfátového pufru, který byl použit při přípravě vzorku BSA. Autorka tyto pufrů rozlišuje jen jako 0.1M fosfátový pufr nebo 0.01M fosfátový pufr. Správný a úplný název je 0.01M fosfátový pufr s 0.15 M NaCl (PBS).

Kapitola „Výsledky“ má 22 stran, na kterých je uvedeno 35 obrázků a tabulek, které se týkají zejména statistického vyhodnocení naměřených dat pro stanovení průměru nanočástic. Text výsledků je pouze na 3 stranách. Z příložených obrázků je zřejmé, že autorka dobře zvládla práci s oběma typy elektronových mikroskopů. Další část této kapitoly je věnována testování připravených a komerčních konjugátů. Bohužel pouhé počty nanočástic neumožňují porovnání s jinými podobnými studii, protože není jasné, na jaké ploše byly částice počítány (ploše fotografie pravděpodobně). Z výsledků je ale vidět, že Pd konjugát je i po 1 měsíci stabilní a funkční. Z předložených výsledků konstatuji, že experimentální cíle práce byly splněny.

Jako zdařilé hodnotím kapitoly „Diskuze“ a „Závěry“. Autorka shrnuje výsledky své práce a kriticky je rozebírá. I když publikovaných výsledků na toto téma není mnoho, porovnání získaných výsledků z výsledky publikovanými v impaktovaných časopisech mohlo být důkladnější.

Formální úprava diplomové práce je výborná. Text je logicky dobře vystaven. Kladně hodnotím také použití tabulek a grafů (pozn. na fotografiích č. 13, 17, 21, 25 chybí měřítko). Stylistická kvalita textu práce má bohužel kolísavou úroveň (str. 16: „...poté se na protilátku primární váže protilátka sekundární, která obsahuje dva, nebo tři markery...“; str.2: „Nějsou

vhodné ani příliš malé markery, a to z důvodu snadného pronikání do tkání, což má za následek zvýšení účinnosti imunoznačení. Pro vícenásobné značení byly proto vyvinuty.....“; str. 49 „skonjugovat“).

Magisterská diplomová práce Denisy Martykánové splňuje požadavky kladené na tento typ prací, a proto ji doporučuji k obhajobě. Celkově hodnotím tuto práci známkou dobře.

Otázky a připomínky k bližšímu vysvětlení:

Jak to bylo ověřeno, že došlo k oddělení promytého konjugátu od nezreagovaných nanočástic centrifugací (v protokolech č. 2-6)?

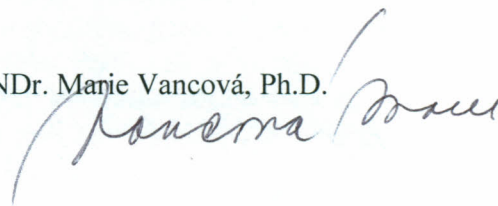
Bylo pH nanočástic před přidáním DHLA upravováno? Je pH důležité pro kovalentní konjugaci s použitím EDC nebo EDC/NHS? Proč se v případě nekovalentní konjugace upravovalo pH Pd15c na pH 8.5?

Co znamená zkratka r IgG (protokol 7) ? Proč byl k protilátkám přidán roztok 2-MEA? Za jakým účelem byly použity kolonky Corning Spin-X UF?

Proč byla provedena centrifugace na sacharózovém gradientu v případě IgG a která frakce obsahovala připravený konjugát?

V Českých Budějovicích 26. 5. 2014

RNDr. Marie Vancová, Ph.D.



Oponentský posudek diplomové práce Bc. Denisy Martykánové s názvem „Nové nanočástice v ultrastrukturální diagnostice“

(Školitelka: Ing. Jana Nebesářová, CSc.)

Předložená diplomová práce o 56 stranách je napsána v českém jazyce. Práce je členěna obvyklým způsobem – zahrnuje literární úvod, formulaci cílů práce, materiály a metody, výsledky, diskuzi, závěry a seznam použitých zdrojů (celkem 36 citací). Téma práce navazuje na publikované práce Laboratoře elektronové mikroskopie v oblasti vývoje nových nástrojů pro vícenásobné ultrastrukturální imunoznačení s použitím nových druhů kovových nanočástic. Diplomantka charakterizovala palladiové nanočástice sférického a kubického tvaru z hlediska jejich vhodnosti pro účely použití v imunodetekci. Autorka dokazuje znalost problematiky a zvládnutí metod transmisní a skenovací elektronové mikroskopie, různých postupů konjugace nanočástic na protein a metod imunoznačení. Za přínos práce považují zejména systematické porovnání vlastností palladiových nanočástic v TEM a FESEM a zjištění nejvhodnějších postupů přípravy konjugátů pro vícenásobnou imunodetekci.

Hodnocení částí předložené diplomové práce

1. Úvod

Úvod je vhodně rozdělen na kapitoly a srozumitelně uvádí všechny pojmy používané v diplomové práci. Dle mého názoru však nebylo dostatečně vysvětleno a zdůrazněno, že komerčně využívané zlaté markery poskytují jen omezené možnosti pro současnou detekci více antigenů, a dále že ostatní způsoby detekce jsou zatím jen testovány, z čehož pak vyplývá zdůvodnění cílů práce.

2. Cíle

Formulace cílů odpovídá náplni diplomové práce. Cíl č. 4 je formulován nejasně a v této podobě splývá s cílem č. 3, i když z dalších částí práce je zřejmé, jaký cíl si diplomantka stanovila.

3. Materialy a metody

Jsou přehledně uspořádány, oceňuji, že na začátku je zvlášť uveden seznam použitých chemikálií a materiálů s výrobcí, což potom zbytečně nezatěžuje popisy jednotlivých postupů. Postupy jsou srozumitelně popsány, podle popisu by se pokusy daly opakovat. V části 3.5. (postupy konjugace různých nanočástic) mi chyběl systematictější přístup k názvům protokolů. U některých protokolů nebyla v názvu pojmenována metoda konjugace, ale jenom název nanočástic a konjugovaného proteinu. Bylo tak obtížné se při čtení zorientovat v rozdílech použitých metod.

4. Výsledky

Výsledky jsou dělené na charakterizaci stability a rozložení velikosti nanočástic v TEM a FESEM, shrnutí úspěšnosti různých postupů konjugace a testování účinnosti a stability připravených konjugátů. Výsledky jsou dostatečně podloženy obrázky z elektronových mikroskopů, grafy a tabulkami s číselnými údaji. Postupy získání dat jsou srozumitelně popsány, slovní popis samotných výsledků je spíše stručnější. Pro lepší orientaci ve výsledcích bych uvítala souhrnnou tabulku (či graf), porovnávající různé druhy charakterizovaných

nanočástic, doprovázenou slovním popisem hlavních zjištění. Takové shrnutí pak nacházím až v diskuzi. Po formální stránce na obrázcích z TEM a FESEM chybí měřítko. Občas jsou zaměňovány termíny „nanočástice“ a „konjugáty“.

5., 6. Diskuze a závěry

Všechny výsledky byly dostatečně diskutovány v kontextu současných poznatků. Závěry odpovídají získaným výsledkům.

Dotazy k obhajobě

Poměr množství nanočástic a proteinu je důležitým faktorem ovlivňujícím průběh konjugace a kvalitu výsledného konjugátu. Jakým způsobem byl testován optimální poměr v použitých protokolech?


Z hlediska perspektivního použití konjugátů palladiových nanočástic pro vícenásobnou imunodetekci:

- jsou sférické palladiové nanočástice rozlišitelné ve FESEM od sférických zlatých nanočástic stejné velikosti?
- na FESEM obrázku kubických palladiových nanočástic (Obr. 17) je poměrně dobře vidět jejich krychlový tvar, avšak ne u všech částic. Myslíte, že by byly dobře odlišitelné od sférických palladiových nanočástic stejné velikosti při současném použití v imunoznačení a pozorování ve FESEM?

Je plánována publikace s využitím výsledků této práce?

Závěr

Cíle práce byly dle mého názoru splněny. Předloženou práci považuji za kvalitní a doporučuji k obhajobě. Navrhuji hodnocení stupněm velmi dobře (2).



V Praze 26.5.2014

Mgr. Vlada Filimonenko, PhD