

Oponentský posudek diplomové práce Tomáše Petra: Histochemická lokalizace GM1 gangliosidu B-podjednotkou choleratoxinu při fixaci tkání formaldehydem nebo acetonem

Předložená diplomová práce je zaměřena na detailní průzkum a stanovení podmínek nutných pro kvalitní histochemickou a imunohistochemickou analýsu gangliosidů v tkáních. Téma vychází z rozporu v literárních údajích týkajících se metody fixace tkáňových řezů před konečnou reakcí. Je třeba zdůraznit že právě tento stupeň může být při detekcích látek lipidního charakteru zdrojem závažných chyb a zkreslujících výsledků vzhledem k možnosti částečné extrakce či posunu lipidů v buněčných strukturách preparátu. Řešení této otázky proto pokládám za vysoce aktuální vzhledem k rostoucímu významu buněčné biologie pro současný výzkum.

Práce má logickou stavbu, je správně členěna do jednotlivých oddílů a dokumentována. Je třeba ocenit také její stručnost. Literatura dobře dokumentuje rozvoj oboru v posledních dvou desetiletích.

Úvod obsažně zpracovává problematiku sfingolipidů z hlediska struktury, vlastností metabolismu a funkcí. Zaměřuje se na sporné otázky průkazu gangliosidů v tkáních s ohledem na jejich vlastnosti a způsob fixace preparátu. Z těchto srovnání vychází cíl práce: zjistit zda při histochemickém průkazu GM1 gangliosidu v kryostatových řezech dochází při fixaci acetonem ke ztrátám gangliosidů, porovnat výsledek s klasickou fixací formaldehydem a navrhnout optimalizující řešení.

Ve výsledcích experimentální práce autor prokázal, že zásadou pro dosažení kvalitní histochemické analýsy gangliosidů je zajištění bezvodého prostředí tj. užití bezvodého acetonu a suchých kryostatových řezů. Rozdíly ve fixaci bezvodým acetonem a 4%formaldehydem nebyly v jaterní tkáni zjištěny.

Dotazy a připomínky:

- Byla ověřena specifická detekce ChT-B na řezech po extrakci lipidů ?
- Předpokládají se stejné výsledky také u glykosfingolipidů méně polárních než GM1 gangliosid?
- Jaký je předpokládaný mechanismus fixací formaldehydem a acetonem?
- Bylo by vhodné ověřit fixaci v kombinaci 4% formaldehyd a aceton
- Je plánováno rozšíření studie na další tkáně (především mozek)?
- Jak si počínat při fixaci preparátů z buněčných kultur?

Str.15 - laktosylceramid je prekursorem většiny *komplexních* glykolipidů (jinak se to může říkat i o glukosylceramidu)

Str.16 - Laktosylceramid je syntetisován v lumen proximální části Golgiho aparátu jak je správně zobrazeno na Obr.6, nikoliv na jeho cytosolické straně jak je zřejmě omylem uvedeno na str.15 a v Obr.5

Str.30 - Obr.14- legenda by měla být obsažnější. Chybí vysvětlivka zkratky WBA

Str.38 - Je nejednotně používáno označení B podjednotky choleratoxinu, ačkoliv je zkratka uvedena v seznamu

Str.49- Obr.20 – jde snad spíše o závislost GM1 na obsahu žlučových kyselin než naopak?

Obr.21 – jak se liší Obr 21 od Obr.20? Které hodnoty patří cholestatickým potkanům?


Str.63/ 65 - u některých citovaných časopisů nejsou dodrženy zkratky (Methods Enzymol, Biochim Biophys Acta).

Str. 45- je postrádán detailnější komentář k Obr.19 (k jednotlivým prezentovaným experimentům) přímo v legendě.

Závěr

Výsledky práce dokazují, že bylo dosaženo vytyčených cílů. V práci nebyly shledány závažné chyby a připomínky jsou většinou formálního charakteru. Téma práce je aktuální a závěry jsou důležitým výchozím poznatkem pro další fázi studia buněčné lokalizace gangliosidů i dalších sfingolipidů při různých biochemických procesech. Práci hodnotím jako zdařilou s kritérii kvalitní diplomové práce.

V Praze dne 16.9.2008



RNDr.Befekadu Asfaw, CSc.