

Posudek práce

předložené na Matematicko-fyzikální fakultě
Univerzity Karlovy v Praze

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> posudek vedoucího | <input type="checkbox"/> posudek oponenta |
| <input type="checkbox"/> bakalářské práce | <input type="checkbox"/> diplomové práce |

Autor: **Marek Dostál**

Název práce: **Zobrazování fluorescenčně značených mitochondrií metodou Biplane FPALM**

Studijní program a obor: *Biofyzika a chemická fyzika – Biofyzika*

Rok odevzdání: 2013

Jméno a tituly oponenta: *doc. RNDr. Jan Valenta, Ph.D.*

Pracoviště: *katedra chemické fyziky a optiky, MFF UK*

Kontaktní e-mail: *jan.valenta@mff.cuni.cz*

Odborná úroveň práce:

- vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Věcné chyby:

- téměř žádné vzhledem k rozsahu přiměřený počet méně podstatné četné závažné

Výsledky:

- originální původní i převzaté netriviální kompilace citované z literatury opsané

Rozsah práce:

- veliký standardní dostatečný nedostatečný

Grafická, jazyková a formální úroveň:

- vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Tiskové chyby:

- téměř žádné vzhledem k rozsahu a tématu přiměřený počet četné

Celková úroveň práce:

- vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Slovní vyjádření, komentáře a připomínky:

Předložená diplomová práce Marka Dostála s názvem „Zobrazování fluorescenčně značených mitochondrií metodou Biplane FPALM“ popisuje pokusy v oblasti tzv. „vysoce-rozlišené“ (super-resolution) optické mikroskopie, které byly provedeny na unikátním mikroskopu Vutara SR-200, jež je pravděpodobně jedním z prvních prototypů mikroskopu využívajících metodu FPALM (Fluorescence Photo-Activated Localization Microscopy) a nachází se v laboratoři Dr. Ježka na Fyziologickém ústavu AV ČR.

Výzkum v oblasti vysoce-rozlišené optické mikroskopie (VROM) je velmi aktuální – jednotlivé techniky byly navrženy nedávno (v posledních asi 10-20 letech) a většinou se nacházejí ve stádiu prvních komerčních prototypů (jako v tomto případě). Jedna skupina těchto metod je založena na lokalizaci jednotlivých luminiskujících molekul, které musí být od sebe tak daleko, aby byly jednoznačně odlišitelné (metoda STORM, PALM a pod.). Teoreticky umožňuje taková „bodová rekonstrukce obrazu“ dosáhnout rozlišení jednotek nanometrů – tedy srovnatelné s elektronovou mikroskopií ovšem bez nutnosti biologické aparatury složitě připravovat (a denaturovat). To činí tyto techniky velmi atraktivními, i když těžko lze předpokládat, že budou použitelné univerzálně.

Jak lze očekávat, technologicky a metodicky nový přístroj bude generovat nejen dříve nedosažitelná data, ale také nové problémy. Proto lze vytušit, že práce pana Dostála nebyla příliš jednoduchá; bylo nutné identifikovat - a ve spolupráci s výrobcem řešit - technické problémy a také hledat metodické postupy pro přípravu vzorků a zpracování dat. Přesto si myslím, že v některých bodech mohla být diplomová práce lepší, což se pokusím vysvětlit níže.

Po technické stránce je diplomová práce dobře zpracována, je zde minimum překlepů a faktických chyb. Členění je klasické: teoretický úvod je rozdělen na „biologickou“ a „fyzikální část“ (zde bych se přimlouval za přesnější název kapitol), následuje „praktická část“ s popisem přístroje a přípravy preparátů, vlastní výsledky zabírají jen 13 stran (z velké části pokryté obrázky a zbytek velmi „řídký“ text), diskuse je na pouhých dvou stránkách, a nakonec najdeme závěr a seznam „literatury“.

Připomínky k úvodním kapitolám se týkají především volby šíře záběru - zdá se mi, že se obecně pojednává příliš širokou oblast na úkor podrobnějšího probrání relevantních oblastí (např. konstrukce mikroskopických objektivů není nijak podstatná, na druhou stranu principy PALM mikroskopie mohly být probrány podrobněji). Některé popisy nejsou příliš přesné – například je rozpor mezi definicí numerické apertury v rovnici (2), kde je symbolem A označena polovina sběrného úhlu (obvykle $\alpha/2$) a obrázkem 14, kde A je vlastně průměr vstupní apertury.

Popis výsledků je dobrý, pouze velké množství mikroskopických obrázků (obr. 28, 31 až 38, 46 až 50) postrádá jakékoliv údaje o měřítku (když už není měřítko přímo v obraze, může být alespoň v popisku zmíněna velikost celkového záběru a pod.). Popis zpracování FPALM obrazu se soustřeďuje prakticky pouze na fitování tvaru vláken. Nijak není pojednáno o vlastní přesnosti zobrazení (lokalizace fluoreskujících molekul) – tedy rozlišení obrazu. Zejména není zmíněno, zda vůbec bylo testováno nastavení podmínek kinetiky aktivace a vybělování (pro dané fluorofory se dá především ovlivňovat intenzitou použitých laserů), doby detekce jednotlivých snímků atd., tak jak je to teoreticky nastíněno na str. 28-29. Nakonec bych poznamenal, že změny mitochondriální sítě v důsledku hypoxie jak byly zobrazené konfokálním mikroskopem (obr. 46-50) mi nepřipadají příliš průkazné.

Z těchto poznámek plynou následující **otázky pro diskusi během obhajoby**:

- Zcela na konci Závěru (str. 68) zmiňujete, že rozlišovací schopnost mikroskopu Vutara je 40 resp. 80 nm, v laterálním resp. axiálním směru, při zobrazení fluorescenčních kuliček a o něco horší při zobrazení mitochondriální sítě. Můžete, prosím, tyto hodnoty specifikovat a nastínit jak se k nim došlo. (Jaké kuličky byly použity? V práci je zmíněno (str. 35) pouze použití „fluorescenčních kvantových teček o průměru 100 nm“ při určování point-spread-function, což jsou objekty podstatně větší než rozlišovací mez.)
- Jaká je teoreticky dosažitelná rozlišovací schopnost přístroje Vutara a čím je v praxi limitována.
- Původního cíle zobrazování endoplazmatického retikula se nepodařilo dosáhnout, neboť nebyl nalezen „vhodný vektor a fluorescenční protein“ pro použitelné značení. Je tento závěr „definitivní“ nebo víte o nějakých možných způsobech řešení?

Závěrem mohu konstatovat, že vytčené zadání bylo splněno a předložená práce splňuje požadavky kladené na diplomové práce. Zvolené téma PALM mikroskopie (z oblasti VROM mikroskopie) je neobyčejně aktuální a bylo umožněno díky spolupráci s Fyziologickým ústavem AV ČR. Je zřejmé, že zprovoznění a testování principiálně nového přístroje je náročným úkolem, který vyžaduje více úsilí a hlubší vhled do fyzikálních principů než při využití standardních technik. To je třeba mít na mysli a ocenit výsledky, ke kterým diplomant dospěl. Na druhou stranu jsou v práci některé výše popsané nedostatky, které mě vedou k tomu, že navrhuji hodnocení známkou velmi dobře.

Práci

doporučuji

uznat jako diplomovou/bakalářskou.

Navrhuji hodnocení stupněm:

výborně **velmi dobře** **dobře** **neprospěl**

Místo, datum a podpis vedoucího/oponenta:

V Praze, 20. května 2013

