

Posudek

na disertační práci Mgr. Veroniky Dvořákové

„Micro/nanoparticles functionalized by biomolecules for the detection of disease-related biomarkers“,

vypracovanou na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické,

Universita Pardubice,

ve studijním programu Analytická chemie, obor Analytická chemie

Detekce a stanovení biologicky aktivních látek patří mezi základní postupy moderních biověd. Z hlediska medicíny je významná detekce biomolekul spojených s rozvojem vážného onemocnění. Pro tento účel se často využívají různé typy imunostanovení, například ELISA. V rámci předkládané disertační práce jsou vyvíjeny nové verze imunostanovení, kombinující tradiční principy ELISA, magnetické nano- a mikročástice, a klasické metody aktivace a zesílení, a využívající novou generaci degekovatelných značek, konkrétně kvantové tečky. Vyvinuté techniky umožnily elektrochemickou detekci různých proteinů, mimo jiné markery vybraných onemocnění. Z těchto důvodů je disertační práce Mgr. Dvořákové aktuální a potřebná.

Vzhledem k počtu publikovaných článků má oponovaná disertační práce strukturu habilitační práce. V úvodní části tato práce poskytuje užitečnou a přehlednou obecnou informaci o syntéze a charakterizaci magnetických částic, o jejich modifikaci, a následném využití v různých oblastech biověd a medicíny. Následující část zahrnuje přehled signálních molekul a nanomateriálů, které jsou využívány v různých typech biostanovení. Závěrečná část úvodu je zaměřena na popis kvantových teček, které vykazují specifické optické a elektrochemické vlastnosti. Informace byly získány z velkého počtu relevantních publikací (včetně nejnovějších publikovaných v roce 2016). Dále práce pokračuje stručným souhrnem cílů a zaměření předkládané disertace. Výsledky a diskuse jsou prezentovány formou vyšších, k tisku přijatých a zaslaných časopiseckých publikací. Před každou publikací je uveden její stručný souhrn a rovněž je popsán příslušný podíl práce disertantky. Následuje stručný závěr disertace.

K disertační práci nemám zásadní připomínky. Práce je velmi dobře koncipovaná a srozumitelná, množství překlepů a dalších nepřesností je malé (viz např. strana 11, správně polyethylene glycol, polyethylene imine). Snad bych jen pro větší přehlednost uvítala názvy publikovaných prací v kapitole 7 v Obsahu nebo jejich seznam na začátku kapitoly.

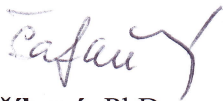
Finálním cílem předkládané práce je elektrochemická imunodetekce vybraných biomarkerů. Magnetické částice slouží pouze jako nosič pro imobilizaci ligandů, nicméně problematika magnetických částic je obsahem celé 2. kapitoly. Proto bych měla několik následujících připomínek, které mohou být zároveň využity jako součást odborné rozpravy.

- Na str. 16 v Tabulce 1 je uvedeno (překlepem při přepisu nebo chybou v citovaném článku), že magnetické částice vykazují feromagnetické vlastnosti. Podle uvedených aplikací se jedná o oxidy železa magnetit a maghemit, které jsou ve skutečnosti ferimagnetické. Jaké materiály vykazují feromagnetismus a které ferimagnetismus?
- V téže tabulce je dále uvedeno, že magnetické částice o velikosti 5-200 nm jsou superparamagnetické. Toto tvrzení může být správné pouze za předpokladu že větší struktury obsahují jednotlivé (tj. od sebe oddělené) superparamagnetické nanočástice. Jaké částice vykazují superparamagnetické chování?
- Na straně 37 v Tabulce 7 je chybně přeložena zkratka MSPE, ve skutečnosti se jedná o „Magnetic solid phase extraction“. Jaký je rozdíl mezi SPE a MSPE?
- V kapitole 3.5. jsou shrnuty nanomateriály využitelné jako značky pro analytické aplikace. Také magnetické částice mohou být použity ke značení (např. <http://www.magnabiosciences.com/technology.html>, http://www.emg.tu-bs.de/forschung/messgeraete/mrx_e.html. Jaký je názor disertantky na možné použití magnetických nanočástic ke značení molekul a buněk?

Z předložené disertační práce je zřejmé, že disertantka vykonala velké množství kvalitní experimentální práce. Výsledky prezentované v disertaci byly rovněž publikovány v impaktovaných časopisech Analytical Biochemistry, Electrochemistry Communications, Chemické listy (2x) a Monatshefte für Chemie. V současnosti je zasláno několik dalších rukopisů. Disertantka prokázala velmi dobrou znalost řešené problematiky a schopnost samostatné vědecké práce, což je dokumentováno i odpovídající publikační aktivitou.

Na závěr mohu konstatovat, že předložená disertační práce Mgr. Veroniky Dvořákové je kvalitní a plně odpovídá všem kritériím na disertační práce dle § 47, odst. 4, zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách. **Vzhledem ke splnění všech formálních i odborných podmínek doporučuji přijmout práci k obhajobě.**

České Budějovice, 30. 12. 2016



Ing. **Miroslava Šafaříková**, PhD.

Oddělení nanobiotechnologie

Biologické centrum AV ČR, v.v.i.

České Budějovice

Oponentský posudek na dizertační práci

Název: **Micro/nanoparticles functionalized by biomolecules for the detection of disease-related biomarkers**

Autor: **Mgr. Veronika Dvořáková**

Školitel: prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D

Školitel specialista: RNDr. Lucie Korecká, Ph.D. a Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.

Oponent: doc. Ing. Jana Drbohlavová, Ph.D.

Téma předložené dizertační práce k obhájení doktorského titulu je věnováno komplexní bio-funkcionalizaci komerčních magnetických nanočástic a kvantových teček v kombinaci s molekulami imunoglobulinu G, které mají využití v elektrochemických biosenzorech, resp. imunosenzorech pro detekci specifických analytů, zejména biomarkerů rakoviny a potravinových bílkovinných alergenů. Práce je napsána srozumitelně v anglickém jazyce formou komentovaného souboru pěti článků publikovaných v impaktovaných časopisech a třech manuskriptů, z nichž dva již byly odeslány k recenzi opět do časopisů s IF, a třetí je v přípravě. V práci jsou využity moderní a inovativní analytické metody využívající miniaturizované elektrody a atraktivní nanomateriály, takže lze s jistotou říci, že zvolené téma práce je vysoce aktuální.

Dizertace působí z hlediska úpravy a celkového vzhledu profesionálním dojmem a obsahuje pouze minimum typografických chyb. Je zřejmé, že autorka vynaložila nutný čas k tomu, aby práce do tohoto stadia dospěla. Práce je rozdělena do devíti logicky na sebe navazujících kapitol, kterým předchází stručný úvod do problematiky. Závěr práce shrnuje nejdůležitější výsledky výzkumu autorky. Výsledky jsou srozumitelně diskutovány a podloženy naměřenými daty. Vzhledem k tomu, že přiložené publikace již byly schváleny v oponentském řízení uznávanými vědeckými časopisy, nelze pochybovat o kvalitě výzkumné práce. Všechny vytčené cíle disertační práce byly splněny.

K práci mám několik připomínek:

- V seznamu zkratk je uvedeno QDs jako quantum dot like immunoassay. V textu na str. 44 tuto zkratku používáte jako quantum dots, v seznamu zkratk se tedy zřejmě jedná o překlep.



- Kvalita některých obrázků není dostatečná – např. obr. 1, obr. 8 a obr. 14 V obr. 3 a obr. 10 je nevhodně zvolená velikost písma.
- Na str. 21 ve druhém odstavci o DLS uvádíte, že velikost je klíčovým parametrem. Pokud máte na mysli parametr pro DLS analýzu jako takovou, je třeba doplnit, že velkou roli hraje i tvar nanočástic – komplikace nastávají u anizotropních tvarů.
- Na některých stranách (19, 21, 23) je zbytečně vynecháno prázdné místo, což lze upravit přeskupením odstavců.
- V tab. 5 je pro SEM i pro TEM metodu uvedena jako nevýhoda, že rozlišení není tak dobré jako v případě SEM.

K obhajobě disertační práce mám následující otázky:

1. V tab. 3 na str. 20 uvádíte základní metody pro přípravu magnetických nanočástic, ale pouze jedna z nich je časově nenáročná. Dovedla byste uvést ještě jinou metodu, která netrvá dlouho (v řádu minut) a poskytuje relativně monodisperzní nanočástice?
2. Na str. 21 jste zmínila důležitost měření Zeta potenciálu jako další možnou metodu charakterizace nanočástic. Můžete pro představu uvést určitý rozsah hodnot tohoto potenciálu, pro který platí, že nanočástice jsou stabilní a nedochází k jejich aglomeraci?
3. Pro název kapitoly 2.3 zabývající se metodami imobilizace biorekogničních molekul jste zvolila poněkud nestandardní pojem „vektORIZACE“. Dle literatury se tento výraz používá pro navázání léčiva na povrch magnetických nanočástic, které pak slouží jako „nanovektory“, tedy pro cílené doručování léčiv. Je opravdu možné/vhodné tento termín použít i ve Vašem případě, tedy pro souhrnné označení biokonjugačních technik, které uvádíte v podkapitolách 2.3.1 a 2.3.2?

I přes zmíněné drobné nedostatky má předložená práce vysokou kvalitu a prokazuje, že Mgr. Veronika Dvořáková má výborný vědecký potenciál. Její vědeckou aktivitu rovněž dokazují přiložené výzkumné články v impaktovaných časopisech, z nichž na dvou je doktorandka jako první autorka.

Práci Mgr. Dvořákové doporučuji k obhajobě pro získání akademického titulu Ph.D. na Univerzitě Pardubice.

V Brně, 3. ledna 2017

Jana Drbohlavová

Posudek disertační práce**Mgr. Veronika Dvořáková****Micro/nanoparticles functionalized by biomolecules for the detection of disease-related biomarkers**

Disertační práce se zabývá modifikací magnetických částic a kvantových teček různými biologicky aktivními molekulami vedoucí k vývoji elektrochemických imunosenzorů pro detekci biomarkerů spojených s různými onemocněními (potravinové alergie, rakovina, atd.).

Disertační práce je psána anglicky, s čímž lze jen souhlasit. Práce působí uceleným dojmem a je logicky rozčleněna. Teoretická část pojednává o přípravě, charakterizaci a využití magnetických částic a kvantových teček v bioanalytických aplikacích. Experimentální část je koncipována jako komentovaný soubor vědeckých publikací. Jde o kvalitní články v impaktovaných časopisech, 3 články prošly oponentním řízením a 2 články jsou rozšířené abstrakty z konference CECE Junior 2013. Další 3 články jsou v přípravě nebo již byly odeslány k publikování v odborném tisku.

Po stránce obsahové rovněž nelze práci mnoho vytknout, neboť jednotlivé zdroje díla prošly oponentním řízením a, jak již bylo zmíněno, byly/budou publikovány v odborných zahraničních časopisech.

Autorka splnila vytčené cíle a k vlastní práci bych měla pouze několik dotazů:

Velká část práce se zabývá nespecifickou modifikací protilátek kvantovými tečkami. Kolik kvantových teček se přibližně váže na molekulu protilátky? Jaká je opakovatelnost výtěžku těchto modifikací? Případně jak je výsledná analýza imunokomplexů ovlivněna různým množstvím navázaných kvantových teček z různých šarží modifikací protilátek?

Vyvinuté imunosenzory využívají elektrochemickou detekci kvantových teček. Mohla byste porovnat citlivost elektrochemického stanovení kvantových teček s detekcí fluorescenční? V čem vidíte hlavní výhodu v elektrochemické detekci?

Můžete porovnat praktickou využitelnost vyvinutých elektrochemických imunosenzorů s běžně používanými ELISA testy (náročnost na laboratorní vybavení, finanční hledisko, citlivost stanovení, atd.).

Uvedené drobné připomínky/dotazy nikterak nesnižují kvalitu předložené práce a vzhledem k výše uvedenému **doporučuji přijetí disertační práce k obhajobě.**

V Brně, 28. prosince 2016



Mgr. Jana Křenková, Ph.D.

Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.