Posudek na disertační práci Mgr. Zuzany Svobodové s názvem

Vývoj a charakterizace imunomagnetických nosičů pro analýzu klinicky významných biomarkerů v mikrofluidních systémech

Disertační práce je obhajována na Fakultě chemicko-technologické na Univerzitě Pardubice. Školitelkou byla doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D. a školícím pracovištěm Katedra biologických a chemických věd tamtéž. K tomu byla část výsledků získána na pracovišti Institut Curie v Paříži ve Francii. Předmětem studia byly mikrofluidní analytická zařízení využívající magnetických nosičů pro afinitní záchyt analyzovaných molekul či buněk. Práce má charakter kombinace autorského textu a příloh článků publikovaných ve vědeckých časopisech. Je psána anglicky. Celý spis má 132 číslovaných stran. Po formální stránce je disertační práce v pořádku, neboť nepostrádá žádnou z požadovaných částí, jako jsou prohlášení o autorství, shrnutí v jazyce českém a anglickém, obsah, seznam zkratek, úvod, teoretickou část s literární rešerší, cíle práce, přehled výsledků s diskusí a závěr. Seznam citované literatury obsahuje úctyhodných 274 položek. Jazyková úroveň je velmi dobrá, v tom je třeba autorku ocenit a její snahu vyzdvihnout. Text je vesměs srozumitelný, nedokonalosti lze považovat za minoritní. Pokud jde o moje připomínky v tomto ohledu (i když nejsem rodilý mluvčí), týkají se především užívání členů, slovosledu, použití gramatických časů a souslednosti časů. Opravy a návrhy jsem provedl tužkou přímo v textu disertace,

Teoretická část je v souladu se zaměřením na prováděné experimenty věnována laboratorní analýze s použitím mikrofluidních zařízení, kdy jsou předně zmíněny především jejich výhody např. pro klinickou diagnostiku (větší efektivita, nižší náklady). Komentována je situace s rozsáhlým vývojem, avšak zaostávající nabídkou na trhu komerčních výrobků. Představeny jsou technologické postupy výroby, mj. odlitky získávané na bázi polymerů či použití 3D tiskáren. Píše se o magnetických materiálech, jejich klasifikaci a rozdílech mezi jednotlivými typy. Zdůrazněno je použití superparamagnetických nano- či mikročástic v bioanalýzách a biotechnologiích zejména při postupech, kde se kombinuje afinitní interakce s možností rychlé separace pomocí magnetu. S tím bezprostředně souvisí shrnutí imobilizačních technik pro vazbu biomolekul či jiných ligandů. Závěrečná pasáž teoretické části je věnována použití magnetických částic v mikrofluidních zařízeních, zvláště technickým řešením pro záchyt těchto částic v metodice zahrnující nanášení, prekoncentraci a eluci vzorku. Text je napsán natolik logicky a výstižně, téměř encyklopedicky, že nemám žádných dotazů, snad jen přípomínku k negativně vyznívající kvalitě některých obrázků a tabulek (rozlišení).

V cílech práce se píše o dvou tématech, kterým se autorka věnovala během svých experimentů, což byl vývoj magnetických imunosorbentů s navázanými protilátkami pro detekci specifických markerů Alzheimerovy choroby (Aβ peptidy) a magnetických částic s polymerní slupkou vhodnou pro vazbu protilátek schopných specificky zachytit metastazující nádorové buňky. Obě dvě témata zahrnovala především optimalizaci přípravy konečného nástroje kombinujícího imunoafinitní interakci se separací vzorku v mikrofluidním zařízení, kde dle mého názoru bylo klíčové zvládnout orientovanou hydrazidovou imobilizaci protilátek prostřednictvím sacharidových struktur. Nadto autorka disertace se spoluautory vypracovala i zajímavou metodu pro rychlou analýzu vazebných schopností protilátek specifickým vůči jednomu danému antigenu nazvanou dot-ELISA. V tomto případě šlo o monoklonální protilátky proti glykoproteinu EpCAM, který je markerem nádorových buněk. Všechny tyto výsledky jsou dokumentovány ve formě publikovaných prací, z nichž většina se objevila v časopisech s impaktovým faktorem (např. Anal. Chem., Biomicrofluidics, J. Biomed. Mater. Res. Part A).

Na polovině z přílohových prací je Mgr. Svobodová první z autorů. Vzhledem k tomu, že však pracovala jako členka širších týmů v rámci řešených projektů, bylo by vhodné, aby při obhajobě blíže specifikovala svůj autorský podíl. Můj dotaz k experimentální části je obecný a týká se obohacení vzorku. Vzhledem k nutnosti fixovat afinitní magnetické částice v mikrofluidních zařízeních pomocí externího magnetického pole se nabízí otázka jiného řešení pro záchyt molekul či buněk, např. s využitím síťoviny z nanovláken či afinitního gelu. Mohla by autorka komentovat vývoj v tomto směru? Bylo by případně možné využít i jiných variant magnetického materiálu než jsou sférické částice?

Závěrem mohu konstatovat, že autorka prokázala schopnost kritické práce s odbornou literaturou, samostatné plánování a provádění laboratorních experimentů, včetně jejich vyhodnocení a diskutování. Splnila tak předpoklady, které jsou nutné k vypracování kvalitního vědeckého spisu. Nedílnou součástí celku disertační práce je i publikační aktivita autorky v recenzovaných vědeckých časopisech a řada konferenčních prezentací. Závěrem mého posudku je jednoznačné doporučení disertační práce k obhajobě před odbornou komisí.

V Olomouci dne 18. 11. 2014

Marek Šebela

Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i.
Veveří 97, 602 00 Brno
Ing. František Foret, CSc.
zástupce ředitelky pro vědu - vedoucí oddělení bioanalytické instrumentace
foret@iach.cz ☎ 532290242

iac brno

Doc. Ing. Jan Fišer, CSc.
Předseda komise pro obhajobu disertační práce
Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Odd. studijní a vědecké agendy
Studentská 573
532 10 Pardubice

V Brně, 5. 11. 2014

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Zuzany Svobodové: „Vývoj a charakterizace imunomagnetických nosičů pro analýzu klinicky významných biomarkerů v mikrofluidních systémech"

Předkládaná práce byla vypracována pod vedením prof. RNDr. Zuzany Bílkové, PhD. na katedře Biologických a biochemických věd, Chemicko-technologické fakulty, Univerzity v Pardubicích.

Text je napsán anglicky, tradiční formou a kromě přehledně zpracovaného úvodu přikládá i komentované experimentální výsledky, které již byly autorkou publikovány v šesti příspěvcích v impaktovaných zahraničních časopisech. Jak autorka uvádí v Souhrnu: „Práce je zaměřená na vývoj magnetických nosičů určených pro použití v mikrofluidních zařízeních sloužících k izolaci a analýze specifických biomarkerů Alzheimerovy choroby, konkrétně peptidů amyloidu β z mozkomíšního moku, a dále k záchytu cirkulujících nádorových buněk vyskytujících se v periferní krvi u pacientů s různými typy adenokarcinomů". Úvodní část přináší na 33 stranách velmi dobře zpracovaný přehled možností využití mikrofluidiky v bioanalýze se zvláštním zaměřením na aplikaci magnetických částic, jejich povrchovou modifikaci a kontrolu externím magnetickým polem. Text je vhodně doplněn řadou obrázků a více než 250 citacemi. Přestože jde o literární přehled se silným zaměřením na studovanou problematiku, je zřejmé, že předkladatelka se velmi dobře orientuje i v dalších souvisejících oborech a experimentálních technikách. Na teoretickou část navazuje text šesti vybraných publikací s rozšiřujícím úvodem.

Cíl práce je po úvodní části definován, jako: „The goal of this work was to developed magnetic immunosorbents (MISs), that consist namely from magnetic microspheres coated with target-specific mAbs, able to efficiently capture and analyze various biomarkers of serious diseases in microfluidic devices". Lze konstatovat, že tento cíl byl splněn a překročen. Rád bych zdůraznil, že studovaná problematika je vysoce aktuální v mezinárodním měřítku, o čemž svědčí nejen velké množství publikací, ale i řada příspěvků na mezinárodních konferencích. Za zmínku stojí fakt, že kromě šesti publikací shrnutých v předkládané disertační práci, které již byly 28x citovány (dle WOS) se předkladatelka

Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i.
Veveří 97, 602 00 Brno
Ing. František Foret, CSc.
zástupce ředitelky pro vědu - vedoucí oddělení bioanalytické instrumentace
foret@iach.cz ☎ 532290242

autorsky podílela i na dalších publikacích a řadě konferenčních příspěvků, které v principu souvisí s předkládanou prací.

Práce je velmi pečlivě zpracována a po odborné ani formální stránce nemám větších námitek. Kromě několika nepodstatných překlepů (viz cíl práce, nebo atom adsorption spectroscopy, molecular adsorption spectroscopy - str. 10) je text na výborné úrovni. Také některé odkazy na webové stránky jsou méně vhodné a budou pravděpodobně v krátké době nedostupné. Tyto drobné výhrady však nijak nesnižují kvalitu práce. V rámci úplnosti širšího úvodu by bylo možné přidat krátkou část o afinitní elektroforéze s citacemi průkopnických prací prof. Tiché a srovnání s chromatografickými technikami. Toto téma navrhuji k odborné diskuzi během obhajoby práce.

Závěrem lze konstatovat, že práce splňuje nároky předpokládané pro obhajobu PhD. Úroveň práce hodnotím výborně a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

František Foret