

Oponentní posudek na dizertační práci Mgr. Jany Srbové na téma „Biofunktionalizace moderních materiálů pro afinitní separace a biokatalýzu“

Téma dizertační práce J. Srbové považuji za aktuální. Polymerní nosiče, ať magnetické částice či vlákna, jsou velmi intenzivně studované materiály využitelné v nejrůznějších oblastech výzkumu i aplikací. Velmi zajímavá je možnost jejich využití v oblasti biověd a biotechnologií, včetně různých oborů lékařství. Tyto materiály mohou najít uplatnění rovněž v celé řadě separačních procesů biologicky aktivních látek z reálných vzorků. Předložená práce se zabývá biofunktionalizací nanovláken a magnetických částic vybranými enzymy a protilátkami za současného omezení nespecifické adsorpce bílkovin. Studován byl vliv nosiče i ligandu a způsobu jeho vazby na výsledné vlastnosti.

Vlastní práce má odpovídající úroveň a je logicky dělena do obvyklých částí počínaje úvodem a teoretickým přehledem. Práce v úvodní části poskytuje užitečnou a přehlednou obecnou informaci o bioafinitní chromatografii, povrchové modifikaci, resp. biofunktionalizaci materiálů, a o metodách snižujících nespecifickou adsorpci bílkovin. Experimentální část, výsledky a diskuze sestávají ze tří článků publikovaných v mezinárodních recenzovaných časopisech, užitého vzoru, jednoho rukopisu odeslaného do redakce a připravovaného rukopisu. V publikacích a rukopisech jsou podstatná zjištění získaná v průběhu vypracování dizertace se snahou o jejich konfrontaci s již popsányými poznatky v této oblasti. Seznam použité literatury sahá až do roku 2015, tj. do roku předložení práce. Četně používané zkratky a symboly jsou shrnuty na začátku práce.

Je zřejmé, že dizertantka v průběhu řešení PhD. nabyla značné zkušenosti v oblasti biofunktionalizace a afinitní separace. Věnovala se i separacím v moderním mikrofluidním uspořádání, včetně magneticky stabilizovaného fluidního lože. Práce je dobře srozumitelná a množství překlepů a dalších faktických nepřesností je úměrné rozsahu textu. Současně ukazuje, že dizertantka vykonala v průběhu studia velké množství experimentální práce, které bylo/bude adekvátním způsobem využito ve vědeckých publikacích.

Po obsahové stránce nemám zásadních připomínek. Mé poznámky a dotazy se týkají spíše formálního provedení. Věřím, že tyto nejasnosti budou v průběhu obhajoby vyjasněny.

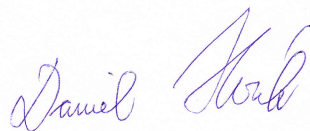
- V seznamu zkratk (str. 9) a na str. 34 je uváděn „CnBr“; správně je to „CNBr“ a jedná se o vzorec, nikoli zkratku.
- K chemickému názvosloví. Nejvíce vytykám, že je nejednotné. V seznamu zkratk je chybně poly(styren), dále v textu je správně polystyren (str. 17, 21, 22), správně je poly(methyl-methakrylát) (str. 21) a ne polymethylmethakrylát (str. 40). V seznamu zkratk je správně poly(dimethylsiloxan), v textu je však polydimethylsiloxan (str. 40). Správně je poly(ethylene oxide) místo polyethylene oxide (str. 81). Správně je poly(ethylenoxid) a ne polyethylenoxid (str. 24), správně je poly(vinylalkohol) a ne polyvinylalkohol (str. 23, 24, 28, 64), rovněž poly(ethylensulfon) a ne polyethylensulfon (str. 24), polyethylen a ne poly(ethylen) (str. 26), lépe je 3-aminopropyltriethoxysilan než γ -aminopropyltriethoxysilan (str. 26), místo

„triethylammonium“ je správně „triethylamonium“ (str. 27), správně je „poly(*D,L*-laktid-*co*-glykolid)“ (str. 28) , „epoxidovou“ skupinu je lépe nahradit „oxiranovou“ (str. 29). V češtině se estery mají psát s pomlčkou, správně je „poly(glycidyl-methakrylát)“ a „poly(2-hydroxyethyl-methakrylát)“ (str. 64).

- Co je „s-triazin“ (str. 34)?
- Místo „skenovací“ je správně „rastrovací elektronová mikroskopie“ (str. 21).
- V Tabulce 2 je poly(vinylalkohol) omylem uváděn i v biopolymerech (str. 24).
- „Vysoce uniformní mikročástice“ – částice jsou buď uniformní nebo ne (str. 19, 22).
- Při studiu nespecifické adsorpce bílkovin byl použit hovězí sérový albumin jako modelový protein. Proč byl vybrán právě tento? Jakým způsobem by se chovaly jiné proteiny, např. pepsin nebo lysozym?
- O modifikaci povrchů částic poly(ethylenglykolem) existuje celá řada publikací. Může autorka porovnat PEGylaci karbodiimidovou metodou s jinými technikami, např. s reverzibilně deaktivovanou radikálovou polymerizací, jako je polymerizace adičně-fragmentačním přenosem řetězce (RAFT) či polymerizace přenosem atomu (ATRP)?
- Na str. 110 je zmíněna 50 nm tloušťka PEG vrstvy dle SEM mikrofotografií částic v suchém stavu. Jaká by byla tato tloušťka u částic ve vodě? Jiní autoři považují za optimální tloušťku *cca.* 15 nm. Může autorka tyto údaje komentovat?
- Proč je účinnost záchytu *Salmonella* bakterií vyšší na nosiči s imobilizovanou KPL anti-Salmonella protilátkou než na Dynabeads anti-Salmonella? (str. 137)
- Slangové výrazy typu „boom“ (str. 11), „selektovány“ a „vyselektovány“ (str. 15), „post-synteticky“ (str. 26, 29), „surfaktant“ (str. 27), „linker“ (str. 33), „chemismus“ (str. 35) do česky psané práce nepatří. Místo „koloidální“ je lepší „koloidní“ (str. 11, 20, 26-28).
- Str. 37-46 jsou v práci uvedeny dvakrát, str. 39 dokonce třikrát.
- Zkratka PVDF není vysvětlena (str. 132).
- V psaní názvů článků v seznamu literatury postrádám jednotné používání velkých a malých písmen (str. 46-61). Zkratky názvů časopisů, jako JoJ. Chromatogr. A (str. 47), J. Polym. Sci. Pt. B (str. 53), TrAc (str. 57) nejsou správné.

Závěrem konstatuji, že výše uvedené poznámky nesnižují kvalitu této dizertační práce. Dizertantka prokázala schopnost samostatné vědecké práce, což je dokumentováno i příslušnou publikační aktivitou. Vzhledem ke splnění všech formálních a odborných podmínek doporučuji přijmout práci k obhajobě.

V Praze, 14. října 2015



Ing. Daniel Horák, CSc.

Oponentský posudek doktorské disertační práce:

Mgr. Jany Srbová (roz. Kučerová): Biofunkcionalizace moderních materiálů pro afinitní separace a biokatalýzu

Aktuálnost tématu

Předložená disertační práce Mgr. Jany Srbové (dále jen disertantky) se zabývá problematikou biofunkcionalizace magnetických částic pro účely bioafinitních separací v mikrofluidním uspořádání a funkcionalizací nanovláken s imobilizovanými proteolytickými enzymy, určenými pro podporu hojení. První část práce je věnována biofunkcionalizaci magnetických částic a chitosanových nanovláken enzymem trypsinem. Ve druhé části je řešena funkcionalizace PEGylovaných magnetických částic specifickými protilátkami. Takto modifikovaný nosič byl následně využit pro imunomagnetický záchyt vybraných buněčných linií. Základní vlastnosti nanovláknenných vrstev jsou určeny zejména použitým polymerem a strukturou. Má-li být dosaženo vyšší třídy vlastností, je funkcionalizace nanovláken stěžejním nástrojem. Magnetické mikročástice pokryté vhodným polymerem jsou dalším velmi perspektivním nosičem pro bioaktivní ligandy, umožňujícím elegantní manipulaci magnetem.

Cíle disertační práce a jejich splnění

Prvním cílem byla biofunkcionalizace magnetických částic enzymem trypsinem, optimalizace metody a potvrzení vhodnosti zvoleného nosiče pro navázání modelových protilátek. Druhým, dobře definovaným cílem, byla vazba trypsinu na chitosanová nanovláknena, prokázání účinnosti enzymu, definování podmínek skladovatelnosti a předběžné testy cytotoxicity. Třetím a posledním cílem byl vývoj specifického imunosorbentu pro mikrofluidní záchyt potenciálně patogenních bakterií z mléka. Cíle práce jsou definovány mimo jiné (i) nalezením rozhodujících parametrů při výběru nosičů, (ii) popsáním kritéria pro výběr vhodného ligandu a (iii) definováním a ověřením parametrů sledovaných po imobilizaci na nosič.

Za velmi přínosné považuji spolupráci více institucí – Ústav makromolekulární chemie AV ČR a Elmarco, s.r.o. Liberec, což umožnilo, že se disertantka mohla plně soustředit na postupy biofunkcionalizace na nosičích připravených tak říkajíc „na míru“.

Všechny vytyčené cíle byly splněny v plném rozsahu.

Formální úprava disertační práce

Disertační práce má rozsah 152 stran a je pojata jako soubor tematicky blízkých publikací, opatřených úvodem a závěrem, což je plně ve shodě se studijním řádem Univerzity Pardubice.

Práce obsahuje též poměrně obsáhlou rešerši, vycházející z citací uvedených na 15 stranách, dále jsou uvedeny tři články, tři rukopisy a jeden užitečný vzor, jejichž je disertantka hlavní autorkou nebo spoluautorkou s uvedeným, procentuálně vyjádřeným podílem na publikaci. Práce je pozoruhodným hybridem českých a anglických textů.

Po stránce formální jsou doprovodné texty napsány přehledně, s dodržováním zvyklostí ve vědeckých publikacích. Logické členění práce dává možnost rychlé orientace. Citace pramenů je na velmi dobré úrovni a použítá literatura je aktuální.

Celá práce je napsána velice dobře. S ohledem na její rozsah je počet drobných chyb zcela minimální a svědčí o dobré redakci spisu. Malé nedostatky, které jsem našla, jsou tyto:

str. 17 Tabulka 1 – domnívám se, že hydroxyalkylmetakrylát je kapalný monomer, takže asi nebude nosičem v chromatografii, pravděpodobně vypadlo slůvko „poly-“, nebo „gel“

str. 22 – výraz „submikronová“ není asi správný, neboť mikron není jednotkou délky a správný výraz by měl být „submikrometrová“

str. 26 – cituji: „Polymery typu PCL, PE nebo PMMA je možné funkcionalizovat fyzikálně-plazmou (argonem, dusíkem, kyslíkem, oxidem uhličitým atd.) Jedná se o velmi šetrný a ekologický způsob, jak zavést do svrchní vrstvy polymeru například karboxylové skupiny nebo aminové skupiny.“ Nedovedu si představit, jak se v přítomnosti argonu či dusíku zavádí na svrchní vrstvu polymeru uvedená funkční skupina. Upřednostnila bych přesnější vyjádření stran možného vlivu pracovního plynu.

str. 23 – má být Petřík a Malý, nikoliv Petřík

str. 26 – ultrafialová polymerizace - autorka má pravděpodobně na mysli polymerizaci iniciovanou UV světlem

str. 28 – ...“ lze funkcionalizovat polykaprolaktamem (PCL)” - prosím objasnit, zdali se míní polykaprolaktam (polyamid - PA 6, Nylon 6) nebo polykaprolakton (polyester - PCL)

str. 40 – „z anorganických materiálů - nejdříve ze silikonu, později i ze skla“- silikon neboli organický polysiloxan je sloučenina s dlouhými řetězci, ve kterých se střídají atomy křemíku a kyslíku.

str. 36 – Tris - postrádám celý název

str. 41 – mT, T – není uvedeno v seznamu zkratk

str. 43 – „setkání ligandu.... s cílovým analytem“ – asi bych preferovala kontakt ligandu s analytem

str. 79 – „In 2005 and 2006....“, viz odkaz 10,11“ : Odkaz 10 se vztahuje na rok 2008.

str. 80 – „pure chitosan from AK Bioteweh (Quilong, China)“ – měl opravdu použitý chitosan stupeň deacetylace 100% ? Pokud ne, jednalo se pravděpodobně o kopolymer chitin/chitosan.

Publikace

Dosažené výsledky byly dostatečně a vhodným způsobem presentovány. Publikační činnost disertantky, včetně jejího spoluautorství na užitém vzoru, je nadprůměrná a více než postačující. Disertantka prokázala v plné míře svoje publikační schopnosti. Jen mi není zcela jasné, kdo a na základě čeho definoval její podíl na publikacích. Jedná se čistě o subjektivní posouzení?

Závěr

K předložené práci nemám zásadní připomínky, drobné nedostatky byly uvedeny výše.

Konstatuji, že předložená disertační práce splňuje požadavky kladené na disertační práci a to po stránce formální, tak i obsahové.

Doporučuji proto, aby předložená práce Mgr. Jany Srbové **byla přijata k obhajobě** ve studijním programu P1419 Analytická chemie, obor Analytická chemie, a aby **byla posouzena kladně.**

V rámci obhajoby práce bych měla na disertantku tyto dotazy:

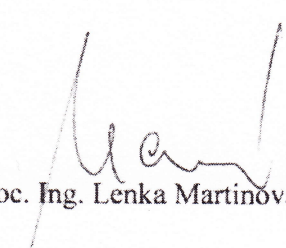
1/ Jaký je rozdíl mezi polymery poly(ethyleglykol) (PEG) a poly(ethylen oxid) (PEO), viz seznam zkratk ?

2/ Proč byl při přípravě chitosanových nanovláken použit PEO a jaká byla jeho molární hmotnost ? (str.81) Nedochází následně při funkcionalizaci nanovláken ve vodném prostředí k jeho vymývání?

3/ Prosím o porovnání použitých nosičů (magnetické částice vs. nanovlákná) mezi sebou, který z nich považujete za perspektivnější a proč?

4/ Který z Vámi dosažených výsledků má nejbliže ke komercializaci ?

V Liberci dne 13. října 2015


Doc. Ing. Lenka Martinová, CSc.

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Jany Srbové
„Bifunkcionalizace moderních materiálů pro afinitní separace a biokatalýzu“

Biospecifické interakce jsou důležitou součástí všech biologických procesů, mezi které lze řadit nejen klasické interakce substrát-enzym, kofaktor-enzym, antigen-protilátka či ligand receptor, ale i komplexnější děje jako jsou přenosy nervových signálů, průběh transkripce/translace či aktivace komplexních enzymových procesů. V současné době je kladen důraz na pochopení těchto interakcí z hlediska mechanismu a síly vazby. Jsou však rovněž hledány nové přístupy při jejich uplatnění v bioanalytické chemii a medicíně, kam rovněž spadá odborný záběr disertační práce Mgr. Jany Srbové. Předkládaná práce se totiž zaměřuje na využití biospecifických interakcí často v kombinaci s magnetickými částicemi pro i) přípravu krytů ran s imobilizovaným trypsinem; ii) modifikaci magnetických částic PEG s ohledem na potlačení nespecifických interakcí při imunozáhytu cirkulujících tumorových buněk ve vsádkovém a především mikrofluidním uspořádání; a iii) využití magnetických částí v mikrofluidním čipu pro imunozáhyt patogenních organismů v mléce.

Disertační práce Mgr. Jany Srbové je psána formou komentářů k publikovaným či k publikaci připraveným pracím, což je formát, který rozhodně preferuji. Vlastní písemná práce přináší ve svém úvodu teoretické základy používaných technik. Následují jednotlivé publikace, ke kterým je sepsán stručný úvod spolu s uvedením podílu disertantky na jejich naměření a sepsání.

K vlastní písemné části, která má, velní dobrou textovou úroveň, a ve které jsem nenašel jedinou chybu či překlep, bych měl několik připomínek:

- 1) Za zmínku by stálo za to uvést, že „Bioafinitní chromatografii“ je možné také využít k analytickým účelům, tj. studiu příslušných interakcí.
- 2) Str. 13 – mezi častěji používané metody založené na afinitních interakcích patří také dvoufázové separace.
- 3) Str. 15 – jako aptamery jsou využívány také peptidy.
- 4) Str. 32 Je pravda, že kovalentní imobilizace ligandu je vždy ireverzibilní?
- 5) Str. 33 – je FA opravdu homobifunkční činidlo?

Práce má pěknou celkovou úpravu a vzhled, a proto vzhledem ke skutečnosti, že dosažené výsledky byly již publikovány a prošly tedy přísným oponentním řízením či jsou

odeslány k publikaci, měl bych pouze tyto otázky:

Str. 88 Co si mám představit pod pojmem operační stabilita nanovláken s imobilizovaným trypsinem, jakým způsobem byla stanovována?

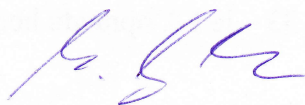
Str. 115 Ephesia čip kombinuje použití permanentního magnetu a externího magnetické pole, jak je toho dosaženo na tak malém prostoru – vzdálenost středů „micropilars“ cca 60 μm (Ideální by bylo čip na vlastní oči shlédnout)? V čem vidíte výhodu tohoto uspořádání v porovnání s průtokovou cytometrií?

Str. 124 V experimentech týkajících se využití fluidního čipu pro vychytávání patogenních bakterií z mléka je v daném okamžiku metoda primárně určena pro selektivní vychytávání patogenních bakterií, s tím, že tyto bakterie jsou následně detekovány klasickými mikrobiologickými postupy. Nejsou problémy s jejich kultivací, když tyto jsou stále navázány na magnetické částice? Tento přístup navíc tuto metodu trochu komplikuje, v textu píšete o jejím dalším rozvoji, mohla byste jej nastínit?

Jsou tyto čipy - Ephesia i fluidní používány opakovaně a jsou komerčně dostupné?

Uvedené připomínky a dotazy se netýkají vlastní podstaty práce. Publikace v renomovaných časopisech, na kterých se uchazečka podílela, potvrzují mimořádnou schopnost Mgr. Jany Srbové k experimentální vědecké práci a to nejenom na domovském pracovišti UPe, ale i na spolupracujícím zahraničním pracovišti Institut Curie. Vzhledem k tomu, že cíle práce byly v plném rozsahu splněny, doporučuji, aby tato byla přijata za základ dalšího řízení a po úspěšné obhajobě byl Mgr. Janě Srbové udělen titul doktor (PhD).

V Brně 5. 10. 2015



Prof. RNDr. Z. Glatz, CSc

Ústav biochemie př.f. MU Brno