

Prof. Ing. Ivo Šafařík, DrSc.
Oddělení nanobiotechnologie
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.
České Budějovice

Posudek na disertační práci Mgr. Zuzany Chaloupkové

„Magnetické nanokompozity využitelné jako vysoce účinné sensory fyziologických procesů s možným diagnostickým nebo terapeutickým dopadem“,

vypracovanou na Katedře fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Ramanova spektroskopie patří k velmi významným nedestruktivním analytickým technikám pro identifikaci různých typů látek, zejména vzhledem k jednoduchosti při přípravě vzorků, přesnosti a rychlosti měření. Jedním z problémů této techniky je však její poměrně omezená citlivost. Možným řešením tohoto problému je modifikace standardní techniky, a sice použití povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, kdy je možné snížit mez detekce studované látky až o několik řádů. Právě tato modifikace, v kombinaci s využitím magnetických nanonosičů, je využita v předložené disertační práci.

Oponovaná disertační práce má klasickou strukturu. Práce v úvodní části poskytuje užitečnou a přehlednou obecnou informaci o Ramanově spektroskopii a o její modifikaci, konkrétně SERS. Rovněž je zhodnoceno použití SERS pro analýzu biopolymerů, zejména nukleových kyselin (DNA, RNA) a proteinů. Dále pokračuje poměrně detailní experimentální částí. Výsledky a diskuze jsou zaměřeny na detailní studium a optimalizaci přípravy nanokompozitů pro SERS s využitím magnetických nanočástic, vývoj metod pro analýzu fyziologicky významných látek, vývoj metod pro Ramanovské studium proteinů a testování vybraných metod na reálných vzorcích. Výsledková část je podpořena velkým množstvím fotografií a grafů.

Je zřejmé, že disertantka v průběhu řešení PhD nabyla značné zkušenosti v oblasti využití Ramanovy spektroskopie při řešení biologických problémů. Obzvláště oceňuji, že kromě modelových biologických systémů byly tyto techniky využity při analýze reálných biologických systémů (lidské zubní vzorky). Práce je dobře srozumitelná. Ukazuje zároveň, že disertantka vykonala v průběhu PhD studia velké množství experimentální práce, které bylo i adekvátním způsobem využito ve 3 vědeckých publikacích.

K posuzované disertační práci mám následující připomínky a dotazy:

- Práce obsahuje několik formálních nedostatků, např. v kapitole 4.1. Chemikálie (např. od firmy Sigma Aldrich byl zakoupen heptahydrát síranu železnatého a rovněž sulfát železnatý heptahydrát, jaký je mezi nimi rozdíl?; v případě chitosanu se zřejmě jedná o nízkomolekulární derivát, ale popis je matoucí; pro methyl alkohol a methanol je vhodné použít jednotné názvosloví; zkratka TBTU není nikde vysvětlena; v případě hydroxidu paladnatého je uvedena koncentrace 20% w/t); v celém textu je nutno dodržovat standardní způsob psaní jednotek (např. pro litr – L nebo l) a koncentrací (buď pomocí lomítka, nebo exponentu), v případě centrifugace je vhodné kromě otáček uvést i hodnotu g. V celé práci je rovněž nutno dodržovat pravidla pravopisu českého jazyka. Lze použité slovo „determinace“ (Kapitola 5.1.) nahradit vhodnějším výrazem?
- Přehled použité literatury je nutno psát jednotným stylem a správně, což nesplňuje část uvedených prací, kdy chybí např. název časopisu nebo knihy, a někdy nejsou uvedeny strany (např. citace 4, 9, 15, 23 apod.). Jakým způsobem jste tuto část zpracovávala, ručně nebo pomocí specializovaného programu?
- V kapitole 4.3.1. popisujete přípravu magnetických nanočástic pomocí Massartovy (s ypsilonem na konci) metody. Jakým způsobem jsou tyto nanočástice stabilizovány?
- V práci používáte nanočástice magnetického derivátu chitosanu pro následnou tvorbu nanočástic stříbra redukcí dusičnanu stříbrného. Jak důležitá je velikost magnetické chitosanové matrice? Lze teoreticky použít pro požadovaný účel magnetické chitosanové mikročástice?
- V Kapitole 5.1. uvádíte: „Dlouhodobá stabilita byla vyhodnocena pomocí pěti po sobě následujících měření provedených v rozmezí 21 dnů. I přes pozorovanou agregaci nanokompozitu Ramanova spektra získané 21 dní po syntéze nanokompozitu obsahují silný analytický signál a nanokompozit může být nadále použit pro analýzu

nukleových kyselin.“ Je možné použít nanokompozit i po podstatně delším skladování, např. v řádu měsíců?

- Na straně 23 uvádíte, že tvar kovových nanočástic v suspenzi lze regulovat přidáním povrchově aktivních látek (surfaktantů) během syntézy. V příslušné citaci 64 je jako stabilizující činidlo použit polyvinylpyrrolidon. Je tato sloučenina surfaktant?
- V práci využíváte magneticky asistovanou povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii. Díky aplikaci magnetického nanokompozitu je možné ze složité biologické matrice specificky selektovat požadovaný analyt a podrobit ho následné analýze pomocí Ramanovy spektroskopie. Jedná se tedy o aplikaci extrakce na magnetické pevné fázi (Magnetic solid phase extraction). Víte, kdo tuto analytickou techniku vyvinul a kdy byla publikována?

Uvedené připomínky nesnižují jinak celkově kladné hodnocení disertační práce.

Na závěr mohu konstatovat, že předložená disertační práce Mgr. Zuzany Chaloupkové odpovídá kritériím na disertační práce dle § 47, odst. 4, zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách. Disertantka prokázala schopnost samostatné vědecké práce, což je dokumentováno i příslušnou publikační aktivitou. **Vzhledem ke splnění formálních i odborných podmínek doporučuji přijmout práci k obhajobě.**

České Budějovice, 30. 10. 2018



Oponentský posudek

disertační práce Mgr. Zuzany Chaloupkové "Magnetické kompozity využitelné jako vysoce účinné senzory fyziologických procesů možným diagnostickým nebo terapeutickým dopadem"

Předložená disertační práce vypracovaná na Katedře fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty a v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů představuje pozoruhodný příspěvek k aplikaci modifikované Ramanovy spektroskopie v oblasti biologie a medicíny, neboť poukazuje na možnost relativně jednoduchých a nedestruktivních metod např. v oblasti diagnostiky nádorových onemocnění. Jde především o využití funkcionalizovaného nanokompozitu na bázi nanočástic stříbra, který má schopnost výrazného zesílení Ramanova signálu. V práci je též demonstrováno použití magnetického nanokompozitu stříbra, který umožňuje zvýšení specifity stanovení požadovaného analytu ve složitém biologickém vzorku.

Disertace se opírá o 3 publikace ve kvalitních mezinárodních impaktovaných časopisech, kdy ve 2 případech je disertantka první autorkou, z toho jednou u článku v prestižním časopise Applied Materials Today. Třetí práce byla v době podání dizertace v recenzním řízení.

Celkově je disertační práce přehledná a členěná do obvyklých kapitol, kdy v úvodní autorka dokumentuje svůj široký literární rozhled ve studované problematice různých modifikací Ramanovy spektroskopie, jejích výhod a nevýhod a aplikací. V metodické části práce jsou detailně a přehledně popsány veškeré použité metodiky, které jsou z hlediska plánovaných cílů práce zcela adekvatní a na úrovni současného stavu metodických přístupů v mezinárodním měřítku. Popis výsledků i diskuse jsou vedeny s velkou pečlivostí a závěry práce jsou adekvatní dosaženým výsledkům. Práce mne zaujala zejména tím, jakou šíři potenciálních aplikací umožňují funkcionalizované nanokompozity v kombinaci s modifikovanou Ramanovou spektroskopií, kdy je možné stanovení nukleových kyselin, prostatického nádorového antigenu, ale i analýza růstových faktorů lidského zubního kořenového kanálu.

Publikované výsledky disertace prošly náročným recenzním řízením, které nejlépe potvrzuje jejich kvalitu. Proto své otázky, komentáře a připomínky omezím na následující:

1. Autorka prohlašuje, že má autorský přínos v uvedených publikacích, ale ten není nijak specifikován např. procentuálně nebo uvedením vlastního přínosu.
2. Myslím, že použití termínu "rakovinný gen" (str. 26) není správné. Prosím o vysvětlení.
3. Stejně tak pojem "karcinogenní buňka" (str. 29) by měl být nahrazen pojmem "nádorová buňka"?

4. Na str. 41 je popsána metoda přípravy vzorků RNA z rakovinných tkání s použitím RNA Later. Byla nějakým způsobem kontrolována integrita izolované RNA. V dané aplikaci pro stanovení celkové RNA to asi není podstatné, ale pro případnou detekci specifických RNA by to asi bylo dobré vědět.

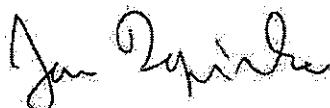
4. Řešená problematika je z hlediska aplikace nanotechnologií v biologii a medicíně velmi perspektivní. Multiplexní analýza celkového obsahu DNA a RNA v rakovinných tkáních je zajímavou aplikací funkcionalizovaného nanokompozitu a dosažená citlivost v řádu ng/L s 10% relativní směrodatnou odchylkou je skvělá. Totéž platí pro stanovení GCPII, jako potenciálního markeru rakoviny prostaty. Otázka je, jak vidí disertantka další vývoj v této problematice, zejména z hlediska aplikací pro stanovení specifických sekvencí DNA a RNA a dalších specifických analytů důležitých v molekulární biologii a biomedicíně? Bude se disertantka nadále problematice věnovat?

Drobný komentář:

V práci se na některých místech vyskytují drobné termínové či gramatické nepřesnosti, které pravděpodobně souvisí zejména s překlady z AJ do ČJ: např. v úvodním Prohlášení má jistě být, že publikace je v "recenzním" a nikoli "rešerzním" řízení, str. 27 "spektroskopie nese význam", str. 29: "detekce viru" nikoli "detekce virusu", atd.

Práce beze zbytku splnila stanovené cíle (popsané na str. 33 disertace) a nevykazuje žádné podstatné nedostatky a výše uvedené komentáře nikterak nesnižují vysokou kvalitu podané disertační práce.

Na základě výše uvedeného si dovoluji konstatovat, že disertantka jednoznačně prokázala schopnost kritického myšlení a samostatné tvůrčí schopnosti řešit vědecké úkoly ve svém oboru, a že disertační práce Mgr. Zuzany Chaloupkové splňuje požadavky kladené na disertaci standardně v daném oboru. Podle paragrafu 47 VŠ zákona 111/98 Sb. disertaci doporučuji k obhajobě.



V Praze 2.11. 2018

Ing. Jan Topinka, DSc.

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4