

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Michaely Čadkové

Vývoj ultrasenzitivního elektrochemického imunosenzoru pro detekci klinicky významných biomarkerů

V předložené disertační práci jsou vypracovány a ověřeny různé typy imunosenzorů využitých pro detekci významných proteinových biomarkerů hrající důležitou roli v diagnostice vybraných nádorových onemocnění. Práce je koncipovaná jako přehledný literární a teoretický úvod popisující aktuální stav výzkumu v této oblasti (cca 40 stran), souhrn výsledků členěný dle jednotlivých publikací doplněný krátkými komentáři (6 stran) a dále kopiemi osmi již zveřejněných publikací, jednoho rozšířeného abstraku a tří manuskriptů připravených k odeslání, kde jsou uvedené experimentální detaily, dosažené výsledky i diskutované interpretace. V uvedených pracích je disertantka celkem 7-krát na prvním místě jako hlavní autor. Součástí je i vyjádření podílu autorského příspěvku k jednotlivým pracím, souhrn publikační činnosti v recenzovaných časopisech a sbornících, obsahující také orální a plakátové příspěvky na konferencích, a rozsáhlý souhrn referencí použité literatury (272 citovaných prací).

Práce je ucelená a komplexní: počínaje samotným návrhem biosenzorů, přes testování nových vhodných materiálů (nové typy magnetických kuliček i elektrodových materiálů), i přístupů detekce (standardně využívané enzymy a substráty, ale i nově kvantové tečky), a optimalizaci detekčních podmínek jak v jednodušším vsádkovém uspořádání, tak s využitím moderních a velice perspektivních mikrofluidních cel.

Po formální i jazykové stránce je práce, s ohledem na její rozsah, zpracována velice pečlivě s minimem překlepů a nesrovnalostí (některé konkrétní připomínky jsou uvedeny v příloze).

K práci bych měl několik dotazů a návrhů do diskuse:

1. Může autorka srovnat LOD hodnoty pro dané analyty (antigeny) již používaných metod s metodami vyvinutých v této práci, např. formou přehledné tabulky?
2. Přinesly nějaké výhody nově syntetizované magnetické kuličky z ÚMCH AV oproti komerčně dostupným? Výhody, cena, dostupnost, opakovatelnost přípravy, velikost částic/kapacita?
3. V pracích je vždy uvedeno hmotnostní množství použitých kuliček (cca 50 μg). Jak byly prakticky kuličky dávkovány? Byly navažovány v suchém stavu nebo pipetovány ve formě suspenze, čemu potom odpovídá uvedená skutečná hmotnost?
4. Je možné pomocí elektrochemických metod určovat kapacity jednotlivých stupňů modifikace (vazebných míst) magnetických kuliček či povrchu elektrod, resp. primárních protilátek či antigenů?

Disertační práce je svým vědeckým přínosem cenná, což potvrzuje i nadstandartní počet příspěvků publikovaných v recenzovaných prestižních světových časopisech. Věnuje se aktuálnímu tématu a má potenciálně vysoký společenský přínos. Zmíněné připomínky nejsou zásadního rázu a nikterak nesnižují její vysokou úroveň.

Závěr:

Předložená disertace dokazuje, že má autorka v oblasti využití elektrochemických analytických metod a biosenzorů značné experimentální i teoretické zkušenosti. Jde o velmi kvalitní práci přinášející nové poznatky, které mají značný význam pro základní výzkum i pro praktické využití. Z těchto důvodů ji **plně doporučuji k obhajobě** jako základ k získání titulu PhD.

V Brně 2. 1. 2017



.....
Aleš Daňhel

Příloha: Formální připomínky a nedostatky

Příloha: Formální připomínky a nedostatky

Disertační práce:

Připomínky:

1. Číslování kapitol by mělo začínat 1, ne „0 Úvod“, ale toto je asi jen důsledek automatického číslování než osobní volby. Bylo by vhodnější číslovat rovněž podkapitoly v 1.1 a v 2.1.1., přispělo by to ke snazší orientaci v textu i obsahu.
2. V kapitole nazvané: „Experimentální část, výsledky, diskuse“, bych očekával alespoň shrnutí využitého materiálu, chemikálií a experimentálních podmínek. Dle mého názoru je toto však s ohledem na celkovou koncepci disertační práce (soubor článků) zbytečné.

Formální nedostatky:

- Str. 15 Chybí: Tyto křivky hrají zásadní roli „**v/při**“ nalezení optimální cut-off hodnoty...
- Str. 23 Chybná logika věty: Právě díky těmto výhodám zatím elektrochemické imunosenzory nebyly doposud ve velkém měřítku nahrazeny ostatními, například piezoelektrickými.
- Str. 26 2x „je“ ve větě: i přes vysokou citlivost, kterou analýza s pomocí těchto elektrod dosahuje, **je** v posledních letech **je** diskutována...
- Str. 30 Překlep ve větě: Fyzikální adsorpce či elektrostatické síly představují nejjednodušší **metodou**, ...
- Str. 50 Překlep ve větě: V oblasti elektrochemických **imunosenzory** v mikrofluidním uspořádání...
- Str. 53 Špatná formulace: **Výhody** elektrochemického mikrofluidního zařízení **bylo** také spojeno s **výhodami** multiplexové analýzy...

Anotace:

Připomínky:

1. Je vhodné dodržovat jednotný formát citovaných prací, a pokud je to vyžadováno, tak u všech uvádět aktuální hodnoty IF, v tomto případě 2015.
2. V případech, kde byly využity kvantové tečky, by bylo užitečné uvést i jejich chemické složení.

Formální nedostatky:

- Str. 8. „flor“ místo „flow-cell“
- Str. 8, kap. 3.1 odst. 3: pokud je sulfanylová skupina zmiňovaná v textu, měla by být vyjádřena v podobě $-SO_3H$ ne jen $-SO_3$, ikdyž možná chybí jen znaménko mínus.
- Str. 9, Obr. 1, Z popisu obrázku by mělo být zřejmé, co znamenají naměřené křivky (vlevo), zejména pokud je jich tam více (jde o opakovatelnost nebo nějakou konkrétní závislost? V konkrétních závislostech je vhodné uvádět i chybové úsečky, které dokládají opakovatelnost daného experimentu.

Str. 9, kap. 3.2 Proč je tato kapitola nazvaná Abstrakt? Pokud jsem tomu dobře rozuměl, jde o článek v knize/sborníku: „Sensing in Electroanalysis“, která by zde mohla/měla být řádně citována.

Str. 10, Obr. 2 Jsou správně uvedené jednotky osy-x? Neodpovídají uvedenému rozsahu v popisku obrázku.

Str. 23 Ve větě: ...thesis was to construct electrochemical immnosensor is based... „is“ je zde zřejmě navíc.

Oponentní posudek doktorské disertační práce
Mgr. Michaely Čadkové, která je nazvána

Vývoj ultrasenzitivního elektrochemického imunosenzoru pro detekci klinicky významných biomarkerů

Oponentské posudky většinou začínají sdělením o tom, co všechno bylo v rámci práce vykonáno a jak dosažené výsledky přispěly k rozvoji vědeckého oboru. O tom všem bych se v úvodu tohoto posudku mohl zmínit, stačilo by mi, kdybych opsal souhrn na sedmé straně. Naprosto netradičně tedy zvolím jiné úvodní věty. Míšu dobře znám z jejích příspěvků na seminářích, které pořádáme pro studenty doktorského studijního programu. Mohu tedy potvrdit, že její vystoupení byla vždy srozumitelná a setkávala se s dobrým ohlasem. Když pak mám hodnotit její překládané literární dílo, mohu s radostí konstatovat, že k němu nemám – pokud jde o odbornou stránku – žádné námitky. Po úvodních stranách (str. 13 – 59) jsou v předložené disertační práci doloženy kopie článků, publikovaných převážně v prestižních odborných časopisech. Je tedy zřejmé, že všechny prošly náročným recenzním řízením (což také usnadňuje oponentovu práci). Blahopřeji! V závěrečných přílohách jsou pak sdělení odeslaná do tisku; rozumím tomu, že se autorka těmito pracemi také chtěla pochlubit, kdyby je ale do práce nezařadila, nesnížilo by to její úroveň.

Bohužel se autorce příliš nepovedl český text, z něhož je zřejmé, že čerpala z anglicky psané literatury. Překlad je umění, a ten se autorce příliš nezdařil. Stačí uvést pár nepovedených vět ze strany 19:

- „Tento objev tak dal vzniknout prvnímu biosenzoru pro stanovení hladin glukózy...“
- „...potřeba ... vedla k jejich rapidnímu rozvoji“
- „Biosenzor je definován jako zařízení ...“;
- „Biologická složka je zodpovědná za rozpoznání stanovovaného analytu ...“; zde naprosto jasně vidím anglický text "The biological component is responsible for recognizing the analyte of interest ..."

Na str. 23: „Tyto převodníky získaly na oblibě...“ – rozumím, ale je to česky?

Str. 26 – v jedné větě dvakrát „je“ (řádky 5, 4 ↑)

Str. 26, 27 – v poslední větě navazující na další stranu špatný slovosled

Str. 44 – větu bych napsal “Lai a kol. (2012) použili ... tištěná čidla obsahující dvě pracovní elektrody“

Str. 57, možná i jinde: Podle našich zvyklostí se ve větném vyjádření může napsat např. „0,01 M roztok“, ale výraz „nM“ se nesmí užívat jako rozměr

Str. 97, 100 – Časopis Chemické listy se v citacích uvádí jako Chem. Listy (s velkým písmenem „L“)

Příloha VI – proč v českém tisku (Chem. Listy) nejsou u jmen autorů použita diakritická znaménka? Tatáž připomínka se vztahuje k autorčině publikační činnosti na stranách 170 - 174

Str. 154 – Příloha 6.12 přece není rozšířený souhrn, je to článek ve sborníku (resp. v knize)

Literatura (od str. 175): Patrně tak velí nějaký předpis, ale osobně se mi nelíbí, že první autor je citován nejdřív příjmením a poté iniciálami, zatímco u dalších spoluautorů je to opačně. Bohužel v tomto ohledu není všeobecná shoda, každá redakce předepisuje jiný postup. Ale nemělo by to dopadnout tak, že ze spoluautorů se objeví jen iniciály (Ref. 108). Ref. 113 není úplná, není uvedeno, v čem se možnosti motivací nacházejí a kde byl článek publikován

Nakonec se musím zmínit o tom, čehož si nemohu nevšimnout:

- (a) uvádění neslabičných předložek na koncích řádků (v celém textu);
- (b) podobně na koncích řádků uvádění iniciál autorů v citacích literatury

Po této kritické pasáži ale musí následovat sdělení, že výše uvedené víceméně gramatické či stylistické poznámky nemají vliv na odbornou úroveň předložené práce. Ta opravdu splňuje všechny očekávané požadavky.

Závěrem tedy doporučuji, aby po její úspěšné obhajobě byl autorce podle platných předpisů přiznán titul Ph.D.

V Pardubicích dne 28. prosince 2016


prof. Ing. Karel Vytrás, DrSc.



Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Michaely Čadkové

V českém jazyce psaná doktorská disertační práce Mgr. Michaely Čadkové nese název „Vývoj ultrasenzitivního elektrochemického imunosenzoru pro detekci klinicky významných biomarkerů“. Jedná se o svazek o 192 stranách, který obsahuje šest kapitol tvořících úvodní literární přehled a komentář k přiloženým publikacím (59 stran) a dvanáct příloh, což jsou kopie odborných článků (psaných v anglickém jazyce a uveřejněných v renomovaných mezinárodních vědeckých časopisech) či manuskriptů o předmětu disertační práce, jejichž je Mgr. Michaela Čadková hlavní autorkou či spoluautorkou. Disertační práci uzavírá bibliografický přehled uchazečky a seznam citované literatury.

Předkládaná disertační práce se zabývá konstrukcí elektrochemického imunosenzoru založeného na principu biochemických metod ELISA nebo QLISA. Jako převodníky elektrického signálu zde sloužily miniaturizované tištěné elektrody a biosenzor byl vyvíjen pro vysoce citlivou a selektivní detekci klinicky významných proteinových biomarkerů v biologických matricích.

Práce Mgr. Michaely Čadkové dává přesvědčivý obraz o spolehlivé odborné kvalifikaci autorky v bioanalytické chemii a elektrochemii. Text disertační práce je psán velmi čtivým a odborně správným jazykem a práce jiných autorů jsou pečlivě citovány. Ojedinelé drobné jazykové chyby mají povahu spíše překlepů či nesprávného použití větné čárky. Po formální stránce je disertační práce provedena velmi kvalitně. Přílohy disertační práce představují publikace uveřejněné v renomovaných mezinárodních vědeckých časopisech, které prošly přísným recenzním řízením.

K předkládané disertační práci mám několik dotazů, které by poukázaly na zkušenost autorky, a tím dokreslily celkový význam předkládané disertační práce, a také abychom se něco více dozvěděli od odbornice na představenou problematiku:

1. Kapitola 2.1: Jaká existují omezení při použití imunosenzorů? Je nutné dodržovat specifické pracovní podmínky (pH, teplota, iontová síla apod.)? Jak se nejčastěji projevuje selhání imunosenzorů?
2. Kapitola 2.1.1: Mezi používanými voltametrickými technikami jsou zmiňované lineární voltametrie (raději voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu) a cyklická voltametrie. Je nějaké obecné pravidlo určující, kdy je lepší upřednostnit při použití imunosenzorů první nebo druhou detekční techniku?

3. Kapitola 2.1.1: Dokázala by autorka stručně pohovořit o historii tištěných elektrod? Lze dopátrat jejich první použití a ukázat, jak se od té doby po současnost vyvíjely jejich konstrukční parametry?
4. Kapitola 2.1.1: Lze antimon skutečně označit za prvek s nízkou toxicitou (ve srovnání se rtuťí)? Mohla by autorka stručně porovnat toxikologická rizika sloučenin antimonu a rtuťi?
5. Kapitoly 2.1.1 a 3: Jaké má autorka zkušenosti s elektrochemickou detekcí značek primární či sekundární protilátky – je možné jejich signály zaznamenat i na elektrodě, na které je celý systém protilátka–antigen navázaný, nebo je třeba nejprve elektrochemicky aktivní látku z konjugátu vyvázat a až posléze detekovat? (Jedná se mi především o situaci, kdy vrstvení několika imobilizačních a imunochemických systémů vede ke stavu, ve kterém je vlastní detekovaná značka v poměrně velké vzdálenosti od povrchu pracovní elektrody).
6. Kapitola 6: V disertační práci je představena celá řada původních výsledků, z nichž většina již byla publikována v prestižních vědeckých časopisech. Kterou ze svých publikací považuje autorka za stěžejní a proč?
7. Kapitola 7: Nacházejí v dnešní době elektrochemické imunosenzory pro stanovení klinických biomarkerů skutečné uplatnění v praxi?

Závěrem bych rád konstatoval, že předložená disertační práce názorně ukazuje, že její autorka má značné teoretické i experimentální zkušenosti v dané oblasti výzkumu. Práce přináší nové výsledky s nesporným významem pro základní výzkum i pro praktické využití.

Mgr. Michaela Čadková takto prokázala své tvůrčí schopnosti a její disertační práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru. Proto předkládanou disertační práci plně doporučuji k obhajobě jako základ pro získání titulu Ph.D.

V Praze, dne 22. prosince 2016

doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie
Hlavova 8
128 43 Praha 2
Česká republika

E-mail: vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz
Tel.: +420 221 951 599, fax: +420 224 913 538