

Oponentský posudek

disertační práce „*Syntéza polymerních nosičů obsahujících aktivní formy chelátů a studium jejich využití v chromatografii na imobilizovaných kovových iontech*“

Mgr. Kateřina Kráčalíková, rozená Mészárosová, PŘF UK v Praze, 2007

Disertační práce je založena na poměrně rozsáhle cílené studii přípravy polymerních sférických nosičů a membrán, jejich modifikaci chelatuujícími skupinami vhodnými pro chelataci kovovými ionty a studium jejich modelového potenciálního využití pro purifikaci globulárních proteinů chromatografií na imobilizovaných kovových iontech (IMAC).

K dosažení cílů byly vytýčeny čtyři hlavní okruhy: 1) příprava a charakterizace vhodných typů sférických částic nosičů, 2) výběr, syntéza a kovalentní ukotvení chelatuujících skupin, 3) kompletace s iontem kovu a modelové studium afinity pro modelový monoklonální globulin (IgG₁) a 4) příprava a studium polymerních membránových materiálů a jejich využitelnost v praxi.

Předkládaná práce obsahuje 143 stran a je formálně členěna do osmi částí, včetně seznamu použité literatury a dodatku s výčtem vlastních prací. Text úvodu a teoretické části má 46 stran, kde autorka přehledně seznamuje s principem IMAC, s přírodními a syntetickými částicovými nosiči, membránovými IMA nosiči včetně některých komerčních výrobků. Rozsah této stati je úměrný tématu práce a logicky řadí jednotlivé kapitoly.

Experimentální část obsahuje 20 stran a seznamuje jak s přípravou polymerních nosičů, jejich modifikacemi a sorpcí iontů, tak i použitými metodami pro charakterizaci produktů a také vlastními modelovými chromatografiemi včetně regeneračních cyklů.

Pasáž výsledky a diskuse je na 69 stranách obsažným přehledem všech modifikací sorbentů, které v průběhu práce byly připraveny, charakterizovány a testovány, jednotlivé oddíly jsou diskutovány tak, jak logicky byly hodnoceny jednotlivé etapy pro postup dalších experimentů.

Seznam literatury obsahuje 141 odkazů a úměrně pokrývá jednotlivé cíle. Práci považuji po formální stránce za vyváženou a řazenou přehledně a srozumitelně dle obecně doporučených pravidel. Text disertační práce je sepsán s vysokou pečlivostí a minimem chyb, řazení informací i použité argumentace jsou logické.

Dotazy a připomínky:

Na straně 70: pasáž na počátku stránky, odkazující se k obr. 5, patrně ve svém obsahu zaměňuje lehké řetězce Ig a fragment Fab resp. F(ab')₂. Expres samotných lehkých řetězců není u savčích buněk obvyklá, zvláště pak v padesátinásobném přebytku. To nastává pouze u nádorových typů (leukemických) buněk. Pravdou však je, že ani lehké řetězce, stejně jako výše uvedené fragmenty, nejsou ani IMA ani bioaktivními běžnými ligandy vázány. Chybí zdůraznění, že jde o myši MP (proti HRP a GTH – obvyklejší mezinárodní značení je hCG). Prepurifikovaný globulin (metodami dle citace 124 a 125) se obecně může značně lišit co do zastoupení jak kontaminantů, tak i vlastních fragmentů. Byly tyto dva preparáty hodnoceny na vstupu elektroforeticky? Byly (kromě ELISA) hodnoceny jinou metodou také eluované frakce popisované v obr. 9? Pokud ano, byly specificky nereagující frakce tvořeny

fragmenty, kontaminanty nebo Ig s indierentní specifickou (např. přirozenými protilátkami donorů ascitických tekutin)?

K textu na str. 84 mám připomínku, že ascitická tekutina je vyvolávána u donorů obecně záměrným injikováním iritans (např. minerálních olejů) u výše použitých MP tedy nešlo o přítomnost patogenu, ale kombinaci iritans a produkčního hybridomu.

Bod 4.5.5. by asi bylo vhodnější nazvat vsádkové experimenty, místo šaržovité experimenty.

Analýzy širokého spektra nosičů a chelatujících skupin včetně kompletace s kovovými ionty a praktické modelové studie afinity pro sorpci proteinů jsou významnými příspěvky k problematice ve vytýčených čtyřech okruzích, Metodicky je práce dostatečně široká a náročná a zahrnuje celou škálu experimentů. I když pokaždé neznamenala experimentální cesta dosažení pozitivního výsledku, jsou jednotlivé kapitoly kriticky analyzovány i ve zdánlivě slepých směrech optimalizace a aplikace. Výsledky jsou přehledně řazeny do jednotlivých závěrečných statí metod a diskuse, všechny hlavní směry práce jsou publikovány v impaktovaných časopisech. Výsledky jsou přehledně řazeny a tabulačně nebo graficky znázorněny. Diskuse a závěry jsou uvážlivě vysloveny a porovnány se světovou literaturou nebo komerčními preparáty.

Závěrem shrnuji: Práci považuji za velmi přínosnou hlavně z hlediska obecných poznatků, ale i praktických možností byť omezených aplikací pro purifikaci některých biomateriálů. Navrhuji oborové komisi ve smyslu zákona 111/1998 Sb. o vysokých školách, aby předložená práce byla uznána jako disertační a byla v tomto smyslu kladně hodnocena.

V Praze dne 2.6.2007

RNDr. Jiří Škvor, CSc.
PřF UK v Praze