

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Jakubová** Jméno: **Katarína** Osobní číslo: **499603**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Název práce: **Testovanie nanovláknenného detektoru pre určenie patogénov v ovzduší**

II. HODNOCENÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Kritéria hodnocení práce		Počet bodů
1.	Splnění cíle a vhodnost struktury obsahu bakalářské práce z hlediska zadaného tématu (splnění zadání). (0 - 30)*	10
2.	Teoretická úroveň a využití dostupné literatury v bakalářské práci. (0 - 20)*	10
3.	Formální náležitosti a úprava obsahu bakalářské práce (úroveň psaní, označení struktury textu, grafy, tabulky, citace v textu, seznam použité literatury apod.). (0 - 10)*	8
4.	Rozsah realizačních prací, aplikovaných vědomostí a znalostí, úroveň metodologického zpracování a závěrů práce. (0 - 40)*	20
5.	Celkový počet bodů	48

* Slovní hodnocení uveďte v komentáři.

III. NÁVRH OTÁZEK K OBHAJOBĚ

1. Pokuste se navrhnout jiný než v práci použitý experimentální postup pro kvantifikaci bakterií zachycených na membráně (bez protilátky). Jakou kontrolu byste nejprve zvolila pro ověření, zda Vámi navržená metoda je vhodná?

2. Můžete prosím v rámci obhajoby ještě jednou podrobně popsat, jak jste po filtraci prováděla promývání nanovláknitých membrán od nespecificky navázaných bakterií? Je možné, na základě Vašich zkušeností, tuto metodu modifikovat? Navrhněte, prosím, experimentální postup, včetně specifikace potřebného materiálu, pro průkaz specifity vazby (na membránu nanosené) protilátky na povrchový antigen bakterie.

3. Víím, že se následujícímu tématu částečně věnujete v literárním přehledu. Přesto mohla byste prosím uvést konkrétní případy možného praktického využití funkcionalizovaných nanovláknitých membrán s vázanou specifickou protilátkou, včetně adekvátních referencí? Specifikujte, jaká protilátka proti jakému antigenu byla použita a jaký je v konkrétním případě přínos oproti nemodifikovaným membránám (bez protilátky).

IV. CELKOVÉ HODNOCENÍ ÚROVNĚ VYPRACOVÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Hodnocení**:	A (výborně)	B (velmi dobře)	C (dobře)	D (uspokojivě)	E (dostatečně)	F (nedostatečně)
Počet bodů:	100 - 90	89 - 80	79 - 70	69 - 60	59 - 50	< 50
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	X

** v případě hodnocení F (nedostatečně) uveďte podrobný komentář

Bakalářskou práci hodnotím výše uvedeným klasifikačním stupněm a doporučuji/nedoporučuji k obhajobě.

V. KOMENTÁŘ

Předložená bakalářská práce se zabývá schopnostmi nanovláknitých membrán zachytávat bakteriální buňky v proudícím aerosolu. Pro tyto experimenty je v laboratoři k dispozici aparatura složená z nebulizéru, pumpy a filtrační komory, kam se membrána umísťuje. Studentka se pokusila stanovit rozdíl v účinnosti zachytu čisté membrány a membrány potažené specifickou protilátkou. Modelovým organismem byla zvolena *Escherichia coli*.

Pro porovnávání účinnosti zachytu byly popisované experimenty sice zřejmě poctivě zpracované, mnohokrát zopakované, avšak předem nevhodně zvolené a v práci samotné poněkud zmatečně prezentované. K jednotlivým metodickým postupům a k formě sepsané práce mám následující připomínky:

1) Modelový organismus: Důvod použití bakterie *E. coli*, ani bližší specifikace použitého kmene není v práci uveden. Usuzuji, že výběr byl dán specifitou povrchového antigenu k protilátce, která byla použita na nanovlákních. Ani zde však není blíže vysvětleno, o jakou protilátku specifickou vůči kterému antigenu *E. coli* se jedná.

2) Filtrace: Ve výsledcích autorka uvádí experiment „A – PAN bez protilátky, B – PAN + protilátka + nebulizér“. Znamená to, že ve vzorcích A nebyl použitý kromě protilátky ani nebulizér? Pokud ano, nevím, co měl experiment ukázat - účinek zachytu přes protilátku nebo účinek nebulizéru? Obecně platí, že do kteréhokoliv experimentu nelze vnášet více než jeden rozdíl oproti kontrolnímu vzorku.

Dále u procesu filtrace postrádám informaci o čase – musí být samozřejmě pro všechny vzorky stejný, stejně jako vstupní hustota bakteriální suspenze. Ta byla sice předem změřená, ale nevím, zda byla tato suspenze v průběhu experimentu vždy promíchávána, aby se zabránilo sedimentaci (např. v experimentech bez nebulizéru).

3) Promývání: Vlastně ani nerozumím, proč autorka čekala větší účinnost zachytu na membráně potažené protilátkou, pokud, jak je v úvodu uvedeno, velikost pórů (nm) nebyla větší než velikost bakteriální buňky. Jelikož byly po filtraci membrány promyty (snad ve vodě?) v ultrazvukové čističce, testovala se spíše účinnost tohoto promývání. Ta však, pokud byla provedena v uzavřeném systému, zřejmě nebyla vysoká, teoreticky záleží na objemu promývací tekutiny (to jsem v práci nenašel). Domnívám se však, že z praktického hlediska nebude mít promývání v suspenzi sonikací uvolněných buněk významný efekt, protože bude docházet k jejich opětovnému zachytu. Pro tento případ bych snad doporučil několikanásobné promývání ve fosfátovém pufru s obsahem detergentu, např. Tween 20.

4) Stanovení výsledné koncentrace buněk: I kdybychom měli po sonikaci membrány lépe promyté (tím mám na mysli maximálně odstraněné buňky, které nejsou vázané přes komplex antigen-protilátka), nelze tento rozdíl určit pouhým stanovením denzity přes noc narostlé biomasy. To by se musely na mediu buňky množit stále stejnou rychlostí, k čemuž však ve skutečnosti nedochází, protože bakterie na pevném mediu lokálně dosahují dříve či později stacionární fáze růstu.

5) Z hlediska zpracování textu práce mám následující připomínky:

Abstrakt a Úvod

V abstraktu neumím přesně odlišit drobné nuance v definicích detektoru, bioreceptoru a bionosenzoru.

V úvodu mi schází popis náplně práce s naznačením výsledků a jejich významu. To je z mého pohledu důležité, protože již při čtení úvodu se čtenář rozhoduje, zda se práci bude věnovat dále nebo zda je pro něj nezajímavá.

Cíle

Cíle by mohly být formulované stručněji a jasněji. Nepatří sem metodický popis ani vysvětlení principů reakcí antigen-protilátka.

Literární přehled

Literární přehled je napsán celkem pochopitelně a je doplněn adekvátní literaturou. Mám zde následující spíše drobné výhrady:

5. řádek na str. 12 je překlep v datu 1900.

Popis obr. 1 by měl být slovensky.

Kap. 3.2.1 Biosenzory – Jak souvisí problematika biosenzorů (tak, jak je definujete) s touto prací? – byly zde

použity?

□ Kap. 3.3 Nanovláknitý detektor – snad by měla být tato část spíše podkapitolou kapitoly 3.1 Nanovlákná?

□ Na str. 19. – nelze zcela souhlasit s tvrzením, že *E. coli* je „najrozšířenějším komenzálním obyvatelom gastrointestinálního traktu...“. Domnívám se, že např. rod *Bacteroides* je zastoupený ještě více.

Metodika

Použitý materiál a metody jsou v práci popsány nesystémově. Je překvapivé, že soupis potřebného materiálu v Kapitole 4.1 a v Tabulce 1 sestává pouze z 5 položek, z nichž 4 jsou komponenty nepojmenovaného agarového média. Pátou položkou je spektrofotometr. V tomto úvodním výčtu není uveden například nebulizér, použité nanovláknité membrány, ultrazvuková lázeň aj. Také různé modifikace experimentálních postupů jsou v práci popsány na různých místech, někdy jsou dokonce experimenty popsány až v diskusi.

Obrázek 8 „Nanovláknité terčíky na Petriho misce po 21 hodinové inkubaci“ není popsán (popisu na samotných Petriho miskách nerozumím) a patří do kapitoly Výsledků.

Zaujala mě použitá varianta filtrace bez nebulizéru, protože nevím, co to vlastně po technické stránce znamená. Bude v takovém případě pumpa odčerpávat suchý vzduch nad hladinou suspendovaných bakterií nebo se bakterie na membránu dostanou též ve formě aerosolu?

Významu další modifikace „Další modifikací oproti skôr popísanej metóde bolo, že nanovlákná neboli následne po filtrácii prečistené ultrazvukovou čističkou, aby sa zabránilo opätovnej aktivácii naviazaných protilátok...“ z hlediska připomínek uvedených výše nerozumím už vůbec.

Filtrační aparatura je v práci ukázána hned na třech různých obrázcích, což je podle mě zbytečné.

Výsledky

Výsledky nemá smysl příliš komentovat, protože podle mého názoru bylo měření množství zachycených bakterií provedeno nesmyslným způsobem. Nicméně mám několik dalších připomínek či doporučení ke způsobu zpracování výsledků:

Kapitulu výsledků doporučuji pro přehlednost členit do podkapitol, které vysvětlují a prezentují výsledky jednotlivých experimentů.

„Namerané výsledky sú uvedené v Tabuľkách 1, 3 a 5“ - Nerozumím, proč stejný typ experimentů je prezentován v několika tabulkách a až v diskusi je celkový výsledek dovysvětlován. Věřím, že tento typ experimentů by se dalo prezentovat úsporněji a pro čtenáře pochopitelněji.

„Tabuľka 5 - Výsledky optickej hustoty nanovláknitých terčikov bez inkubácie“ – Způsob provedení experimentu bez inkubace není v metodice ani ve výsledcích vysvětlen. Diskuse se těmto experimentům věnuje, např. „... výsledky experimentov bez inkubácie po filtrácii sú až 4,34- krát lepšie ako s inkubáciou.“ Nevím, co si autorka představuje pod pojmem „lepší výsledek“. Z řečeného mi však vůbec není jasné, co vlastně bylo měřeno a jaký byl důvod takového měření.

Diskuse

Kapitola Diskuse není diskusí. Studentka pouze opět popisuje jednotlivá měření a občas něco dovysvětlí. Autorka zcela rezignovala na to, aby své závěry uvedla do souvislostí s relevantními fakty, publikovanými v odborné literatuře. Rovněž by bylo vhodné častěji text doplnit odkazy na vlastní výsledky - obrázky a tabulky - v této práci, aby se čtenář lépe orientoval.

V diskusi nerozumím poznámce na straně 45: „Pri treťom pokuse sa nechali vzorky sedimentovať, aby došlo k usadeniu nežiadúcich častíc, uvoľnených z nanovláknien. Išlo prevažne o vzorky C.“ Pokud studentka nechala vzorky sedimentovat, sedimentovaly i buňky, čímž by došlo k dalšímu zkreslení výsledků.

Domnívám se, že experimentální design nemohl vést k řešení hlavního cíle tak, jak byl naformulován. Rovněž způsob sepsání bakalářské práce, zejména nesystematický popis experimentů, zbytečně složitá prezentace výsledků a diskuse postrádající citace (s jedinou výjimkou), neodpovídá běžným standardům takové práce. V předkládaném stavu nedoporučuji tuto bakalářskou práci k obhajobě. Pokud se však při obhajobě samotné prokáže, že se v důležitých aspektech, které práci vytýkám, mýlím nebo jsem příliš striktní, velice rád své doporučení změním. Je rovněž možné ze strany studentky celkové hodnocení vylepšit na základě adekvátních odpovědí na tři výše naformulované dotazy, které podle mého úsudku reflektují tři největší slabiny obhajované práce.

Pro úspěšnou obhajobu nicméně doporučuji práci doplnit alespoň jedním validním experimentem, u kterého bude jasně definovaný cíl, tedy co přesně hodláte testovat a z jakého důvodu. Pokud by to bylo např. testování efektivity záchytu bakterií přes vázané protilátky, doporučuji experiment zaměřit především na techniku promývání a následné eluce s použitím adekvátního např. komerčně dostupného promývacího a elučního pufru. Rovněž stanovení koncentrace bakterií vyplavených z obou membrán do elučního pufru je potřeba provést adekvátním způsobem, nejlépe ředící řadou a spočtením narostlých CFU na misce.

Pokud je to technicky možné, můžete se pokusit stanovit účinnost záchytu membrán, např. podržením Petriho misky v proudícím vzduchu za membránou po daný čas.

Předpokládám, že s celou aparaturou se pracuje v laminárním boxu s parametry biohazard (třída II.). Přesto je nutné vzít v úvahu, že mikroskopická narušení membrány mohou způsobit únik aerosolu s bakteriemi do prostoru. Doporučuji proto, aby se při této práci raději používal i respirátor, aby se minimalizovalo riziko respirační nákazy.

V textu samotné bakalářské práce doporučuji na základě výše zmíněných experimentů adekvátně upravit především kapitoly Metodiky, Výsledků a Diskuse tak, aby reflektovaly výše zmíněné připomínky.

V Praze dne 30. 05. 2023
RNDr. Jan Bobek, Ph.D.

Jméno a příjmení: RNDr. Jan Bobek, Ph.D.
Organizace: Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK
Kontaktní adresa: Studničkova 7, Praha 2

Podpis:

Datum: