

Název disertační práce: Design and realization of the principle of label free detection of DNA molecules using NV centre quantum electron transitions in diamond nanosensor
Autorka disertační práce: Ing. Marie Krečmarová
Program doktorského studia: Biomedicínská a klinická technika
Vysoká škola: ČVUT v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství

Při posuzování disertační práce jsem vycházel ze skutečností uvedených v předložené disertační práci, autoreferátu, vlastních publikací autorky, aktuálnosti tématu, způsobu a metod řešení, dosažených výsledků a způsobu zpracování práce.

a) Aktuálnost tématu disertační práce

Problematiku uvedenou v disertační práci s názvem "Design and realization of the principle of label free detection of DNA molecules using NV centre quantum electron transitions in diamond nanosensor" lze považovat za vysoce aktuální a v současné době vědecky rozvíjenou, zejména ve spojení s rozvojem nových materiálů a technologických přístupů pro zvyšování citlivých diagnostických metod pro využití v různých typech biosenzorů. Práce je zaměřena do materiálové a technologické oblasti s využitím diamantové platformy. Předmětem zájmu práce je výzkum nového DNA mikrofluidického biosenzoru založeného na kvantových snímacích principech. Je navržen systém, ve kterém tzv. barevná centra v diamantu, tj. mřížkové bodové defekty pracují jako molekulární senzory. Návrh využívá specifických vlastností nábojových stavů center dusík-vakance (NV) v diamantu propojením s elektrochemickou detekcí NV center nábojových stavů optickým snímáním.

Práce je v úvodu zaměřena na syntézu diamantového materiálu metodou MW PE CVD. Jsou definovány optimální podmínky syntézy na základě znalostí materiálového inženýrství, následuje definování elektrických, morfologických a optických vlastností diamantových vrstev. Dotáčnické nečistoty a NV bodový defekt je využit pro návrh optimální sensorové funkce. Senzor NV se používá k detekci molekul nesoucích elektrický náboj jako molekula DNA v kombinaci s elektrochemickou detekcí.

Sledovaný výzkum je v současnosti v popředí zájmu a výzkumu předních světových laboratoří, v této oblasti jsou řešeny i evropské projekty. Zvolené téma práce je jednoznačně vysoce aktuální.

b) Splnění sledovaných cílů disertační práce

Cíle práce jsou široce definovány na str. 13 – str. 17. Hlavním cílem je výzkum a vývoj nového typu DNA mikrofluidického senzoru založeného na NV optickém detekčním systému s použitím metody detekce elektronového náboje v kombinaci s elektrochemickým vyhodnocováním. Pro realizaci hlavního cíle je v textu stanoveno 9 dílčích cílů:

- Studium dotace bóru v konvenčním mikrovlákném rezonančním MW PE CVD nanokrystalickém a monokrystalickém diamantovém růstu za účelem nalezení nejlepších podmínek pro výrobu diamantové elektrody (elektrické, optické a morfologické vlastnosti).
- Studium dotace dusíku v MW PE CVD NCD a růstu monokrystalových diamantů pro NV centra (morfologie a vlastnosti fotoluminiscence).
- Studium NV fotoluminiscence v NCD a monokrystalovém diamantu jako funkce koncentrace zabudovaných atomů bóru.
- Elektrochemická impedanční spektroskopie pro studium BNCD/NCD elektrod jako funkce tloušťky NCD vrstvy.

- Realizace mikrofluidického NV diamantového senzoru.
- Studium pasivního nábojového stavu NV s kyslíkovým a vodíkovým povrchovým zakončením.
- Studium aktivního nábojového stavu řízení NV při aplikaci elektrického pole.
- Detekce DNA bez E3 (PEI a PEI-DNA funkcionalizovaná diamantová plocha).
- Detekce DNA s využitím elektrochemické impedanční spektroskopie.
- Detekce DNA pomocí NV nábojových stavů.

Dílčí stanovené cíle práce mají výzkumně-laboratorní charakter, jsou stanoveny k podpoře a dosažení poznatků hlavního cíle.

c) Metody a postupy řešení

Pro řešení daných problémů se využívají metody typické laboratorní experimentální práce s časově náročným množstvím laboratorní práce. Metody použité pro řešení práce jsou odpovídající stanoveným cílům. V práci je obsaženo relativně velké množství výsledků (kap. 4), doktorandka zvolila přehlednou formu jejich předložení ve formě jednotlivých kapitol 4.1 až 4.10, jsou zde popisovány metody řešení a materiály, dosažené výsledky s diskuzí a řada kapitol a podkapitol je zakončena shrnutím dosažených výsledků. Práce je složena z několika vzájemně provázaných témat řešených v kapitolách 4.1 až 4.10. Uspořádání kapitoly 4. hodnotím velmi pozitivně, jedná se o jádro práce. Vlastní práce je zpracována na vysoké odborné úrovni.

d) Výsledky disertační práce a konkrétní přínosy uchazečky

Problematika řešená v disertační práci je velmi aktuální, náleží do oblasti vývoje nových biochemických struktur s využitím nových perspektivních materiálů. V předložené práci je tato problematika dostatečně popsána, práce uvedenou problematiku rozvíjí, přináší nové přístupy a poznatky ke zlepšení vlastností a parametrů, zabývá se optimalizací technologických přístupů. Autorka se v práci zabývá řešením deklarovaných cílů s využitím experimentálních metod, měřením vlastností realizovaných laboratorních vzorků. Výsledky práce přinášejí nové poznatky ve využití zkoumaných struktur.

e) Význam pro praxi a rozvoj studijního oboru Biomedicínská a klinická technika

Svým obsahem práce jednoznačně náleží do doktorského studijního oboru „Biomedicínská a klinická technika“, dosažené výsledky obor rozvíjí, přinášejí nové poznatky o kterých lze předpokládat, že následně v nejbližší budoucnosti budou využitelné v praxi. Pozitivem práce je i skutečnost, že dosažené výsledky lze aplikovat do vzdělávacího procesu, zejména magisterského a doktorského studia.

f) Formální úprava disertační práce a její jazyková úroveň

Vlastní práce je vypracována s velkou pečlivostí s důrazem na odborné části práce, i přes tuto pečlivost se v práci objevily drobné, ale pro obsah práce nepodstatné formální nedostatky. Práce je napsána na 146 stranách včetně použité literatury, k tomu je přidán přehled vlastních publikací včetně konferenčních příspěvků doktorandky, celkem práce obsahuje 148 stran.

Práce je přehledně rozdělena do 5 hlavních kapitol, počínaje kapitolou 1 (Úvod) a konče kapitolou 5 (Závěry). Těžiště práce je uvedeno v kapitole 4 (str. 53 až str. 130), jednotlivé dílčí problematiky jsou řešeny v podkapitolách 4.1 až 4.10. V kapitole 1 je uveden úvod do problematiky biosenzorů, kapitola 1.3 je věnována cílům práce. Kap. 2 představuje literární rešerši dané

problematiky (str. 17 až str. 44), kapitola 4 tvoří jádro práce, kapitola 5 shrnuje dosažené výsledky, v kapitole 6 je uveden přehled použité literatury a kapitola 7 je tvořena seznamem zkratk, seznam symbolů bohužel chybí. V seznamu publikací autorky je uvedeno 6 publikací s přímým vztahem k disertační práci, z čehož jsou 2 tituly v impaktovaných zahraničních časopisech (IF=1,53, 2 citace a IF=11,38, 69 citací). Další publikace je impaktovaná s IF=1,53 se 3 citacemi, publikace v recenzovaném časopisu s 1 citací. U 4 titulů je autorka uvedena jako vedoucí autor na prvním místě. Dále je v seznamu uvedeno 11 příspěvků na konferenci, z čehož je 7 zahraničních (5 příspěvků s orální prezentací ve sborníku a 6 příspěvků ve formě posterů). Přehled použité literatury se 127 tituly je uvedený na str. 137 až str. 145.

Práce je psána velmi přehledně s dobře zvolenou strukturou s drobnými formálními nedostatky uvedenými níže v textu. V textu jsou důsledně zařazovány odkazy na literaturu, a to ve vzestupném pořadí. Za poměrně velký nedostatek práce považují absenci seznamu symbolů, v textu je uvedeno několik rovnic a dále se v textu vyskytují různé symboly. Pozitivně hodnotím dílčí části práce (kapitoly nazvané jako Conclusions), kde se doktorandka pokusila shrnout dosažené aktivity popisované v dané kapitole. Na druhou stranu mi však chybí širší diskuze dosažených výsledků s výsledky uváděnými v publikované literatuře, a to i v závěrečném hodnocení dosažených výsledků práce.

Na začátku práce před obsahem je uvedeno poděkování za podporu řešení aktivity (granty a osoby).

g) Dotazy a připomínky k disertační práci

Kladně v práci hodnotím zejména:

- Dílčí části práce kap. 4 nazvané jako Conclusions, kde se doktorandka pokusila shrnout dosažené aktivity popisované v dané kapitole. Jedná se o kap. 1.1.2/str.57, kap. 4.1.3/str. 63, kap. 4.1.4/str. 68, 71, kap. 4.2.2.1/str. 80, kap. 4.2.2.2/str. 82, kap. 4.3.2/str.87, kap. 4.4.1/str.91, kap. 4.4.2/str. 94, kap. 4.4.3/str. 97, kap. 4.5.1/str.100, kap. 4.6.1/str. 105, kap. 4.6.2/str.108, kap. 4.6.3/str.113, kap. 4.7.2/str. 117, kap. 4.8/str.120, kap. 4.9/str.127.
- Informace autorky o jejích realizovaných aktivitách v rámci kolektivní práce, tj. určení podílu autorky na výsledcích disertační práce. Jedná se o kap. 4.1.1/str. 54, 55, 56, kap. 4.2.1/str.89, kap. 4.5.1/str. 98, kap. 4.6.2/str.102, kap. 4.6.3/str.109, 110, 111, kap. 4.7.2/str.115, 116, kap. 4.8/str.118, kap. 4.9/str.121, 122, kap. 4.10/str.128, 130.
- Text je zpracovaný po odborné stránce na vysoké úrovni, po stránce formální s drobnými nedostatky.
- V textu jsou uváděny odkazy na vlastní publikace.
- Důsledné dodržování mezery mezi číslem a fyzikálním rozměrem v celém textu práce.
- Fyzikální rozměry jsou důsledně uzavírány do kulatých závorek u vlastních textů a obrázků (u převzatých obrázků se používají hranaté i kulaté závorky).
- Obrázky jsou zpracovány s vysokou grafickou úrovní, škoda že popisy jsou různě velkým fontem.

Připomínky formálního charakteru:

- Grafická podoba obrázků je nevyvážená, tj. popisy uvnitř obrázků mají různou velikost.
- Chybí seznam symbolů s jejich fyzikálními rozměry (seznam zkratk je v práci uvedený).

- V textu se mnohokrát objevuje špatné rozdělení slov na konci řádku, např. str. 45/Fig-ure, str. 58/pol-ished apod.
- Jednotka tlaku (Torr) je zastaralá, nedoporučuje se užívat, ačkoliv u řady přístrojů je dodnes tlak udáván v (Torr), je třeba používat jednotky ze soustavy SI, např. str. 98.
- Str. 28/obr. 25/pravý. Nevysvětlené symboly U_{SE} , U_{SD} , I_D .
- Popisy obrázků mají různou logiku. Např. pravý, levý nebo (a), (b), (c) za popisem nebo před popisem obrázku, např. str. 33/obr. 32 jsou před popisem, str. 34/obr. 33 jsou za popisem, str. 35/obr. 34 je uveden levý a pravý obrázek. Nejednotná logika se objevuje i u vlastních obrázků autorky v kap. 4.
- Str. 39/obr. 38, str. 41/obr. 40. Popis os fontem bold, u ostatních font standard.
- Str. 39/obr. 38, str. 41/obr. 40. U osy y nejsou uvedeny fyzikální rozměry luminiscenční intenzity.
- Str. 43/obr. 42. Oproti zvyklostem je osa x popsána obráceně (hodnot rostou směrem vlevo). Osa y nemá označený směr vynášené veličiny, není uvedený fyzikální rozměr u energie.
- Str. 45/obr. 44. U popisu obrázku chybí označení (a), je zde uvedeno pouze (b).
- Kap. 4/obrázky. Někde je pořadí označovány velkými písmeny, např. str. 68/obr. 66, jinde malými, např. str. 72/obr. 68.
- V textu i v obrázcích i tabulkách se používá označení fyzikálního rozměru odporu v různém tvaru, tj. např. ohm.cm, str. 64/Tab. 1, str. 62/obr. 60, jinde Ω .cm, např. str. 76, str. 63/obr. 61.
- Fyzikální rozměr u intenzity (osa y) je někde ve tvaru (a.u.), např. str. 74/obr. 70, jinde ve tvaru (arb. units), např. str. 79/obr. 75.
- Str. 89/obr. 84. Místo fyzikálního rozměru (μA) je použita zkratka (uA).
- Str. 119/obr. 118, str. 128/obr. 127 c), d). Chybí fyzikální rozměr na ose y.
- Str. 124/Tab. 7/poslední řádek, str. 127/Tab. 8/poslední řádek. Výraz (10^{-3}) není fyzikální rozměr.
- Kap. 4/fyzikální rozměr teploty. V obrázcích se používá fyzikální rozměr udávaný v (K) nebo ve ($^{\circ}C$). V práci by mělo být jednotné.
- V textu není jednotné označování pojmu. Např. str. 66/1. řádek/ označení N_2 , na 2. řádku je pojem nitrogen, na dalších řádcích téže stránky opět označení N_2 .
- Označení exponentu. V textu se používá různé značení exponentu. Např. str. 67/označení ve tvaru 10^{17} cm^{-3} , str. 64/Tab. 1/tvar $2.2E+20 \text{ cm}^{-3}$, str. 63/označení ve tvaru $1e20 \text{ cm}^{-3}$.

Dotazy věcného charakteru:

- Vědecké přínosy práce lze z disertační práce vyčíst, ale vědecké přínosy nejsou dostatečně zvýrazněny. Jaký vlastní původní vědecký přínos práce považuje autorka za nejvýznamnější?
- V práci postrádám širší diskuzi dosažených výsledků s výsledky uváděnými v publikované literatuře, a to zejména v závěrečném hodnocení dosažených výsledků práce.
- Kterou publikaci lze označit z pohledu autorky za nejhodnotnější a proč?
- Byly nebo budou některé části práce patentovány, popř. kým?
- Jak budou dosažené výsledky využity v dalším výzkumu, popř. praxi?
- Jaké bude další směřování tohoto výzkumu?

- Je možné realizovat systém s mikrofluidickou strukturou, mikropumpy a mikroventily v českých podmínkách?

h) Závěr

Předložená práce představuje ucelené zpracování problematiky. V práci jsou naplněny všechny části požadované na práci tohoto typu. Doktorandka prokázala v práci schopnosti samostatné vědecké práce a orientaci v dané problematice.

Doporučuji podle zákona č.111/1998 Sb. § 47 disertační práci k obhajobě pro udělení akademického titulu „doktor“ (ve zkratce Ph.D.) v doktorském studijním programu *Biomedicínská a klinická technika*.



prof. Ing. Miroslav Husák, CSc.
oponent

Adresa:

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta elektrotechnická
Technická 2
166 27 Praha 6
Tel.: 02-2435 2267, fax: 02-2431 0792,
e-mail: husak@fel.cvut.cz

v Praze dne 27. 03. 2018

