

V Praze 24. května 2013

Oponentský posudek k disertační práci Bc. Pavly Krulišové "Zavedení ELISA metody na magnetických částicích pro průkaz specifických protilátek proti biomarkerům Alzheimerovy choroby.

Diplomová práce byla vypracována na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice pod vedením Mgr. Barbory Jankovičové. Konzultantka práce byla doc. RNDR. Zuzana Bílková, Ph.D.

Zadáním diplomové práce bylo vypracovat metodu imunoenzymatického stanovení biomarkerů Alzheimerovy nemoci (AN), konkrétně protilátek proti beta amyloidu ($A\beta$) s využitím magnetických částic.

Diplomová práce má krátký úvod (1 str.), obsáhlé teoretické pojednání (31 str.) s charakterizací AN a rozbohem biologických markerů, používaných v její diagnostice. (se zaměřením na $A\beta$ a protein tau a jeho fosforylovaných forem). V další části jsou diskutovány metodické aspekty stanovení těchto biomarkerů (především imunoenzymatické metody). Dále jsou nastíněny autoimunitní aspekty AN a možnosti měření autoprotilátek a jejich použití v diagnostice AN.

Následuje jednostránková konkretizace cílů diplomové práce a experimentální část (44 str.)

Výsledky jsou diskutovány na 60 str. a závěry shrnuty na 1 a půl stránce.

Diplomová práce je doplněna seznamem použitých zkratk a obsahuje 148 literárních nebo webových odkazů (jsou dodrženy citační normy).

Těžištěm práce je samozřejmě experimentální část a hodnocení výsledů. Přístup autorky k řešení zadaného problému je třeba hodnotit jako velmi odpovědný a důkladný. Protože $A\beta$ je drahá chemikálie, byla celá procedura přípravy imobilizovaného ligandu a optimalizace metody vyzkoušena na modelových systémech s IgG a α -chymotrypsinem. Bylo tak otestováno několik dostupných nosičů a několik způsobů imobilizace. Parametry získané během optimalizace jsou v práci velmi dobře dokumentovány, stejně jako popisy pracovních postupů. Velká pozornost byla věnována minimalizaci nespecifických interací. Na základě výsledků těchto pilotních experimentů bylo přistoupeno k přípravě zakotveného $A\beta$ a následně vypracování metody kvantifikace protilátek proti $A\beta$ v séru pacientů s AD a kontrol.

Ačkoliv teoretická část zahrnuje informované načrtnutí řady diskutovaných problémů, autorka se nevyhnula některým zjednodušením nebo nejasnostem.

Při popisu AN je opomenuto, že se vyskytuje ve dvou formách: familiární neboli časně (s jasnou hereditární podstatou, s nástupem projevů před cca 40. rokem života; v cca 5% diagnostikovaných případech) a tzv. sporadické formě, která se projevuje většinou po cca 65. roce života a má nejasnou etiologii.

Je mi nejasná definice poly- a monovalentních protilátek, jak ji používá autorka v kapitole "Polyvalence protilátek". Podle mé představy jsou "polyvalentní" protilátky tvořené spektrem protilátek proti danému antigenu, obsahující imunoglobuliny s heterogenními vazebnými místy (proti různým epitopům daného antigenu), což je dáno faktem, že jsou produkty celé řady "klonů" aktivovaných B-lymfocytů. To je v kontrastu s monoklonálními protilátkami, které jsou produktem jednoho "klonu" a jsou identické (a tudíž monovalentní dle definice). "Monovalentní" protilátky jsou pak ty, které se váží na identické vazebné místo. Samostatnými otázkami jsou samozřejmě specifita, afinita nebo avidita protilátky. (Navíc nechci komplikovat jednoznačnost definice faktem, že IgG obsahuje 2 (identická) vazebná místa a IgM ještě více. Předstírejme, že věta v této závorce nebyla vyřčena).

Jako nelogické mi připadá, že autorka zvolila vmezeřit metodickou sekci **2.5 (Enzymová imunoanalýza)** mezi dvě části, věnované AN.

Při poměrně detailním výčtu různých forem ELISA metody postrádám zmínku o tzv. kompetitivní ELISE, kdy o vázané místo zakotvené protilátky kompetuje analyt s označeným ligandem. Toto uspořádání, které bylo přežato z RIA metod sice není příliš rozšířené, ale lze se s ním občas také setkat.

K výsledkové části mám také několik připomínek.

Autorka uvádí, že pro imobilizaci IgG a α -chymotrypsinu byly použity jedno i dvoukroková imobilizace EDAC a pro IgG poskytla lepší výsledky dvoukroková a pro α -chymotrypsinu dvoukroková metoda. Jednoduše tabulovaná data data pro toto tvrzení pro IgG jsem však v práci nenašel a pro srovnání u α -chymotrypsinu je třeba porovnávat graf č. 2 s grafem č. 11. Dále je zřejmý nepoměr mezi množstvím α -chymotrypsinu imobilizovaného jedнокrokovou metodou (graf č. 4: cca 18 $\mu\text{g}/\text{mg}$) a jedнокrokovou s následným PEG (graf č. 11: cca 37 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Navíc – u grafu č. 11 mi není jasný původ hodnot "množství imobilizovaného α -chymotrypsinu" v levé polovině grafu.

Zdá se, že nebyla vyzkoušena dvoukroková imobilizace A β s následnou imobilizací PEGu. Je možné, že i tento postup by poskytl "dobrý" konjugát?

Bylo by dobré porovnat více parametrů (především detekční limit (LOD: limit of detection), citlivost (LOQ: limit of quantification) a použitelný dynamický rozsah metod ELISA použitých na destičkách a s magnetickými částicemi. Jejich číselné vyjádření v práci postrádám. Autorka měla k dispozici vhodné reagentie u obou systémů (α -chymotrypsin a příslušnou protilátku i A β s příslušnou protilátkou). Jsem přesvědčen, že tyto parametry je možno ze získaných dat vypočítat.

Pro proložení závislosti absorbance na koncentraci analytu není lineární závislost nevhodnější (resp. je (quasi)lineární pouze v omezeném rozsahu) (graf č. 15, 16); odpovídající závislost je pravděpodobně hyperbolická, nebo při logaritmické transformaci koncentrace analytu tzv. 4-parametrová logistická.

Závěrem lze konstatovat, že navzdory těmto několika připomínkám dosahuje předkládaná práce vysoké kvality, podle mého názoru překračující nároky kladené na diplomovou práci. Autorka prokázala schopnost plánování vhodných experimentů, zvládnutí poměrně náročných laboratorních metod i následného kritického zhodnocení získaných výsledků. Vychází z poučené literární analýzy problematiky AN obecně a použití biochemických metod pro její diagnostiku speciálně. Je zcela zřejmé, že práce vyžadovala vysoké pracovní nasazení. Autorce se podařilo vyřešit řadu metodických postupů, které usnadňují použití magnetických částic například při diagnostice závažných patologických stavů v uspořádání, které zlepšuje dosud používané metody např. v citlivosti, rychlosti, snadnosti provedení a dalších parametrech. Dosažení cílového stavu bude vyžadovat ještě další úsilí, ale nabízí příslib dobrých výsledků. Práce je psána hezkou češtinou, s minimem překlepů, splňující parametry odborné literatury.

Práce splňuje předpoklady potřebné pro předložení k obhajobě: doporučuji ji hodnotit známkou "výborně".

RNDr Jan Řičný, CSc

Laboratoř biochemie a patofyziologie mozku

Psychiatrické centrum Praha

Ústavní 91

181 03 Praha 8