

Oponentský posudek diplomové práce

Název diplomové práce: **Vývoj MELISA metody pro stanovení autoprotilátek spojených s Alzheimerovou chorobou**

Autor práce: **Bc. Věra Vozandyčová**

Vedoucí práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**

Konzultant práce: **Mgr. Pavla Krulišová**

Oponent práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**

Předložená diplomová práce se zabývá zavedením metody ELISA na magnetických částicích (MELISA) pro stanovení protilátek proti amyloidu beta, který je významným biomarkerem Alzheimerovy choroby. Optimalizována byla především příprava nosiče zahrnující výběr vhodných částic a postup imobilizace ligandu s cílem zajistit maximální vazebnou kapacitu a minimální nescifickou sorpci. Vybraný nosič byl následně použit pro stanovení specifických protilátek v patientských sérech metodou MELISA a pro srovnání bylo současně provedeno i stanovení standardní ELISA metodou.

Diplomová práce má přiměřený rozsah (118 stran) a klasické členění, zahrnuje krátký úvod, konkretizaci cílů diplomové práce, následuje teoretická část (34 stran), experimentální část (16 stran), výsledky jsou shrnuty a diskutovány na 24 stránkách, a závěr pak na necelých dvou. V průběhu práce i v seznamu literatury (celkem 270 citací) studentka správně používá a dodržuje citační normy.

Teoretická část se věnuje patofyziologii a charakteristice hlavních biomarkerů Alzheimerovy choroby, dále pak výskytu autoprotilátek při tomto onemocnění včetně uvedení metod jejich stanovení. V experimentální části jsou popsány použité metodické postupy zahrnující metody charakterizace a přípravy nosiče, dále metody stanovení navázaného ligandu a nakonec postup ELISA metody jak standardní v mikrotitrační destičce tak nově zaváděné na magnetických částicích. Získané výsledky jsou doloženy formou tabulek, grafů a obrázků ve výsledkové části popř. v příloze a jsou patřičně diskutovány.

Práce je sepsána srozumitelně s přiměřeným množstvím stylistických neobratností a překlepů. Po formální stránce splňuje požadavky na ni kladené a lze také konstatovat, že bylo dosaženo zadaných cílů diplomové práce.

K předložené práci mám pár drobných připomínek:

- V práci je uveden zvlášť seznam použité literatury a seznam internetových zdrojů, který číselně navazuje ale pořadím neodpovídá umístěním v textu, takže např. hned na první stránce teoretické části (str. 12) je po citacích 8 a 9 uvedena citace 249, což může působit zmatečně. V číslování je navíc zřejmě chyba, kdy v seznamu chybí citace 266 a naopak je dvakrát uvedena citace pod pořadovým číslem 270.

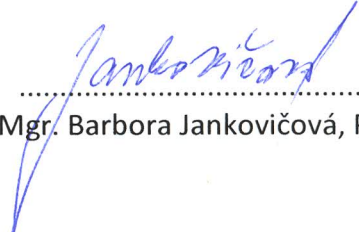
- V rámci členění kapitol v experimentální části jsou veškeré postupy zařazeny pod kapitolu „3.2 Charakterizace a příprava magnetického nosiče“, minimálně postupy ELISA metod, by však bylo vhodnější vyčlenit zvlášť.
- V experimentální části je pár nepřesností: v tabulce 3 a 4 na str. 55 při uvedené koncentraci zásobních roztoků proteinů 1 mg/ml by ve zkumavkách 1 měla být koncentrace 100 µg/ml a ne uvedených 200 µg/ml; na str. 56 u elektroforézy chybí složení vzorkového pufru popř. uvedení, zda se jedná o komerční produkt, v postupu přípravy gelu je pak zaměněn roztok D za C, kterým je persíran amonný dávkovaný jako poslední.
- U grafů 5, 6 a 7 je pod zkratkou KO uvedeno sérum kontrolního pacienta, zřejmě se jedná o nepřesné označení kontrolního séra zdravého jedince.

Doplňující otázky pro studentku jsou následující:

- 1) Pro stanovení množství A β peptidu navázaného na částice je v práci používána Tricin-SDS-PAGE elektroforéza, nejedná se ale o standardní postup ale modifikovaný postup s přidavkem močoviny, což by mohlo být pro úplnost zmíněno v názvu metody. Mohla by jste vysvětlit, proč je v tomto případě močovina přidávána?
- 2) Při srovnávání nosičů s různě orientovaným A β peptidem (Obrázek 22, str. 77) je potřeba uvážit také specifitu stanovovaných protilátek. Je-li peptid vázaný přes raménko, kdy je stéricky přístupný N-konec peptidu společný pro všechny základní isoformy A β peptidu, lze předpokládat, že se budou vázat protilátky proti všem těmto isoformám. Zatímco v případě vazby A β peptidu bez raménka, kdy se předpokládá stérická přístupnost C-konce peptidu specifického pro isoformu A β (1-42), bude na nosič vyvázána pouze určitá frakce anti-A β protilátek právě se specifitou k isoformě A β (1-42). Na str. 80 je tak uvedeno nepřesné tvrzení, že vazebné místo pro anti-A β (1-42) protilátky se nachází u N-konce A β (1-42) peptidu. Narazila jste v literatuře na práce zabývající se klinickým významem nebo stanovením protilátek přímo proti jednotlivým isoformám A β peptidu příp. jak zde byla řešena orientace antigenu?

Závěrem lze konstatovat, že navzdory připomínce, práce dosahuje dostatečné kvality a splňuje předpoklady potřebné pro **doporučení k obhajobě**, a s ohledem k uvedeným skutečnostem práci hodnotím známkou **velmi dobře**.

V Pardubicích dne 22.5.2017



 Mgr. Barbra Jankovičová, Ph.D.