



Oponentský posudek diplomové práce

Název diplomové práce: **Sledování podmínek tvorby a stability imunokomplexů v chemicky různorodém prostředí**

Autor práce: **Bc. Lucie Čalová**

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

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

Předložená diplomová práce studentky Lucie Čalové se zabývá srovnáváním účinku vybraných chaotropních látek a detergentů za různých reakčních podmínek na imunokomplex tvořený mezi antigenem vázaným na stěně mikrotitrační destičky a specifickou protilátkou ze séra. Pro detekci je použita klasická sendvičová metoda ELISA, kdy se míra rozvolnění vazby mezi antigenem a protilátkou po ošetření testovanými látkami hodnotí reakcí se sekundární protilátkou značenou enzymem. Pro vyjádření účinku jednotlivých chaotropních látek a detergentů slouží tzv. aviditní index vyjadřující koncentraci činidla, při které dochází k uvolnění 50 % protilátek z imunokomplexu. Navíc je stanovením aktivity modelového antigenu α -chymotrypsinu ověřováno, zda za daných podmínek nedochází k poškození biologické aktivity reagensů.

Diplomová práce má klasické členění, zahrnuje krátký úvod, obsáhlou teoretickou část (24 stran), následuje jednostránková konkretizace cílů diplomové práce a experimentální část (9 stran), výsledky jsou diskutovány na 36 stránkách a závěry shrnuty na 1 stránce. Celkový rozsah práce je včetně příloh, seznamu použitých zkratk a literatury 110 stran. V průběhu práce i v seznamu literatury (celkem 83 citací) studentka správně používá a dodržuje citační normy. Po formální stránce práce splňuje požadavky na ni kladené a je napsána stylisticky dobře a čtivě s minimem překlepů.

Teoretická část se věnuje podrobné charakterizaci antigenů a protilátek včetně popisu jejich reakce, dále je zpracován přehled základních imunoanalytických metod spolu s metodami používanými pro stanovení avidity protilátek a nakonec je uveden popis chaotropních látek a detergentů. V experimentální části jsou popsány metodické postupy, které si studentka zvládla osvojit v rámci této diplomové práce, zahrnující jednak optimalizaci testu ELISA, testování účinku vybraných chaotropních látek a detergentů metodou ELISA doplněnou o tzv. rozvolňovací krok, a dále pak stanovení aktivity α -chymotrypsinu v různém uspořádání. Ve výsledkové části jsou interpretovány získané výsledky, které jsou přehledně doloženy formou tabulek a grafů. Všechna stanovení byla prováděna ve dvou na sobě nezávislých měřeních a pro úplnost jsou veškerá naměřená data použita pro sestavení grafů uvedena v příloze. Předložené výsledky umožňují učinit závěry a hodnocení a lze tedy konstatovat, že základních cílů diplomové práce bylo v průběhu řešení dosaženo.

K předložené práci mám několik drobných připomínek:

- v teoretické části bych doporučovala pro lepší přehlednost a orientaci v textu podrobnější členění do podkapitol, některé základní kapitoly popisují různorodou problematiku a jsou natolik rozsáhlé, že by tomu tak mohlo být učiněno

- u některých obrázků převzatých z cizojazyčné literatury (obr. 1 a 5) chybí úprava do češtiny, která by byla pro jednoznačnost žádoucí
- v rámci optimalizace podmínek ELISA metody bylo testováno různé ředění konjugátu (1 : 2000 - 1 : 64000), v experimentální části je ovšem v popisu metody (kap. 4.6) nesprávně uvedeno, že tímto způsobem bylo ředěno vyšetřované prasečí sérum a konjugát byl použit v konstantním ředění 1 : 8000
- v textu je používáno nepřesné označení "prasečí konjugát" pro králičí protilátky proti prasečím IgG značené HRP, pro vyjádření zjednodušeného označení této reagentie by pak bylo přesnější použít výraz králičí konjugát vzhledem k jeho původu

Doplňující otázky pro studentku jsou následující:

- 1) U tabulek č. 28, 31 a 34, v nichž jsou uvedeny naměřené hodnoty pH testovaných roztoků, není jasné, proč jsou pro každou koncentraci roztoku uvedeny dvě hodnoty pH, jedná se o dvě nezávislá měření, z nichž je počítán průměr, který je pak v textu dále používán při hodnocení výsledků nebo jde o opakované měření pH téhož roztoku po 15 minutách jak je to vyjádřeno v tab. 25? V textu není uvedena tabulka hodnot pH jednotlivých roztoků TFA s 1% SDS, z výsledků (např. obr. 40) vyplývá, že tyto hodnoty byly totožné jako v roztocích odpovídající koncentrace TFA bez přídavku SDS, bylo tomu skutečně tak?
- 2) Ve výsledkové části v kapitole věnované optimalizaci (kap. 5.2) není dostatečně popsán princip hodnocení, není zde jasné, co znamená srovnávaný poměr P/N a co bylo použito v tomto experimentu jako negativní kontrola. Navíc zde není zcela jasně vysvětleno, proč byly jako optimální podmínky vybrány koncentrace antigenu 30 µg/ml a ředění konjugátu 1 : 8000, když na předchozí stránce v souvislosti s tabulkou č. 9 je uvedeno, že nejvyššího poměru P/N je dosaženo při použití koncentrace antigenu 15 µg/ml a ředění konjugátu 1 : 16000?
- 3) Pro stanovení aktivity α -chymotrypsinu byl použit nízkomolekulární substrát SUPHEPA, který ovšem za testovaných podmínek např. při stanovení ve zkumavkách (kap. 5.4.2) nevykazoval dostatečnou citlivost, bylo by v tomto případě možné použít nějakou alternativní metodu, která by citlivost stanovení zlepšila?

Závěrem lze konstatovat, že navzdory připomínkám, práce dosahuje vysoké kvality. Je zřejmé, že práce vyžadovala vzhledem k objemu dat vysoké pracovní nasazení a dosažené výsledky jsou zajisté přínosné pro další využití. Práci proto **doporučuji k obhajobě** a doporučuji ji ohodnotit známkou **výborně**.

V Pardubicích dne 24.5.2013



 Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.