

Oponentský posudek diplomové práce

Název diplomové práce: **Optimalizace podmínek imunomagnetické separace pro záchyt kalretikulinu, biomarkeru zánětu, ve vzorcích plodové vody**

Autor práce: **Bc. Tereza Veselá**

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

Konzultant práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

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

Předložená diplomová práce se zabývá přípravou imunosorbentu tvořeného specifickými protilátkami vázanými na vybraných superparamagnetických částicích pro průkaz kalretikulinu v plodové vodě souvisejícího s rizikem vzniku zánětu. Optimalizována byla především příprava imunosorbentu zahrnující výběr vhodných částic a protilátek s cílem zajistit maximální vazebnou kapacitu a specifitu.

Diplomová práce má 139 stran, což je na tento typ práce spíše nadprůměrné. Zmíněný rozsah je především díky obsáhlé teoretické části zahrnující 60 stran. Teoretická část se věnuje popisu plodové vody a patologických stavů v těhotenství, dále pak biomarkerům intrauterinního zánětu včetně kalretikulinu, který je specifikován podrobněji, a nakonec je přiblížena problematika imunomagnetických separací. Následuje konkretizace cílů diplomové práce a na ní navazuje experimentální část, která na 21 stránkách podrobně popisuje použité metody přípravy imunosorbentů s modelovými a specifickými protilátkami, dále kontrolní metody SDS-PAGE a dot-blot a nakonec postup ověření funkčnosti specifického imunosorbentu. Výsledky jsou shrnuty na 20-ti stránkách, kde jsou doloženy formou obrázků či tabulek a jsou patřičně diskutovány.

Práce působí uceleným dojmem s přiměřeným množstvím překlepů a pouze občasných stylistických neobratností. Po formální stránce splňuje požadavky na ni kladené. Z pohledu čtenáře bych možná jen uvítala zkrácení některých částí práce např. kapitola 1.2, která má oproti ostatním kapitolám stejné úrovně dvojnásobný rozsah přesahující 20 stránek, by mohla být o něco stručnější. Oceňuji ovšem studentčinu pečlivou práci s literaturou, kterou dokazuje úctyhodných 266 literárních zdrojů citovaných správně podle citačních norem.

K práci mám pár drobných připomínek: v obsahu nejsou uvedeny seznamy ilustrací, tabulek a zkratk; v kapitole 1.2 je chyba v číslování podkapitol; některé zkratky nejsou přesně definovány (např. qRT-PCR, HNP); převzaté obrázky s anglickými popisky nejsou přeloženy do češtiny.

Na studentku mám pak ještě následující doplňující otázky:

- 1) Na straně 95 máte uvedeno, že se po oxidaci roztok protilátek a jodistanu sodného zakoncentruje na AMICON filtrech, následně se pak vzorek opět doředuje, šlo tedy v tomto kroku pouze o zakoncentrování nebo byl i jiný důvod jeho provedení?
- 2) Na straně 100 v postupu ověřování funkčnosti specifického imunosorbentu není zmíněn objem, ve kterém probíhala vazba antigenu. Dále je zde uvedeno, že se

vazebná frakce po inkubaci zakoncentrovala na AMICON filtrech 100K/10K, prosím o upřesnění cut-off hodnot používaných filtrů v souvislosti s molekulovou hmotností cílového antigenu v zakoncentrované frakci?

- 3) Na straně 101 je uveden seznam částic použitých pro vazbu nespecifických IgG. U jednotlivých typů částic jsou uvedené parametry dostupné od výrobce, ne vždy je definována velikost částic případně jeho vazebná kapacita. Jaký je obecně vztah mezi těmito dvěma parametry?
- 4) Na str. 106 je nepřesná formulace v názvu kapitoly 4.1.3, kdy se nejedná o magnetické částice s modifikovaným Proteinem A ale magnetické částice modifikované Proteinem A. Na str. 107, kde hodnotíte účinnost vazby protilátek na tyto částice, uvádíte, že se jedná o neorientovanou imobilizaci, jinde v textu je ale zmíněno, že by mělo jít o vazbu orientovanou. Prosím o ujasnění a vysvětlení rozdílu mezi orientovanou a neorientovanou vazbou protilátek. V úvodu této kapitoly je ještě zmínka o tom, že vzniká kovalentní vazba, v teoretické části na str. 74 je však uvedeno, že vazba přes Protein A je nekovalentní, prosím také vysvětlit.
- 5) Na str. 102, jsou nedostatečně zhodnoceny výsledky dot-blotu, je pouze uvedeno, že byla prokázána reaktivita u tří vybraných klonů protilátek, ale chybí zhodnocení ostatních. Navíc je uvedeno, že vybrané klony 9B4 a 4D4 jsou purifikované a klon 5.1 nepurifikované protilátky. Na Obr. 23, 24 a 25 to ovšem vypadá opačně, prosím o vysvětlení.

Závěrem bych ráda konstatovala, že studentka evidentně udělala velký kus práce a získané výsledky budou zajisté přínosné pro řešení projektu, jehož byla tato práce součástí. Práci proto **doporučuji k obhajobě** a hodnotím ji **známkou C**.

V Pardubicích dne 1.6.2022

.....
Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.