Oponentský posudek disertační práce

Mgr. Barbory Jankovičové,

Téma práce: Strukturální analýza potravinových alergenů metodou mikrofluidní imunomagnetické separace

Předložená práce Mgr. B. Jankovičové je sepsána v rozsahu 144 stran formátu á 4, řádkování 1,5. Text je doplněn 22 tabulkami, 67 obrázky a 262 recentními i historickými citacemi. Disertační práce je členěna do 4 částí, teoretická část, experimentální část, cíle disertační práce a výsledky s diskuzí. Předložený text je doplněn o výsledky publikační a vědecké aktivity (příloha 1 až 3). Práce je napsána pečlivě a čtivě, s minimem překlepů a nepřesností. Z tohoto mála nepřesností považuji za důležité poopravit datum objevu IgE, o kterém bylo publikováno Ishizakem v roce 1966 a ne v roce 1960 (str.18) nebo sjednotit údaje o molekulové hmotnosti alergenů na straně 31 a straně 32. Také je potřebné upřesnit terminologii, „trvání klinické alergie na ..." přesnější termin „klinické projevy alergie na..." (str. 34).

Vzestup incidence alergických onemocnění je nejen zdravotním problémem, ale má i rozměr sociální a finanční. Léčbu alergických stavů můžeme rozdělit do dvou odlišných přístupů. Symptomatickou léčbu, která přináší nemocným okamžitou úlevu od alergických symptomů (úlevová medikace). Druhou variantou je léčba „kauzální" označovaná jako hyposenzibilizace, specifická alergenová (imuno)terapie (SAIT) nebo specifická imunoterapie. Disertantka se zaměřila na identifikaci a charakteristiku potravinových alergenech epitopů. Alergenová imunoterapie je empirickou léčbou i přes zavedení standardizačních postupů v přípravě alergenových vakcín. Není pravdou, jak disertanka uvádí v úvodní kapitole str. 25, že SAIT je provázena vysokým procentem výskytu nežádoucích účinků. Výskyt systémových, tedy závažných reakcí souvisejících s aplikací vakcíny, se uvádí méně než 1 případ na 10 000 nemocných. Podstatně vyšší riziko komplikací, včetně úmrtí, je např. u léčby antibiotiky.

Ve své práci Mgr. Jankovičová se na modelu ovalbuminu podrobně zabývala metodickými aspekty výběru alergenních epitopů pro přípravu „hyposenzibilizačních" vakcín. Na základě literárních i vlastních zkušeností porovnala několik proteolytických systémů. Pomocí techniky MALDI-TOF-MS detekovala přítomnost peptidových fragmentů s alergenními epitopy. Nálezy potvrdila metodou Q-TOF-MS umožňující aminokyselinovou sekvenční analýzu zachycených fragmentů. Porovnáním svých výsledků se závěry jiných

autorů dokázala, že jí použitá metoda imunomagnetické epitopové extrakce je vhodný k průkazu klinicky významných epitopů na dalších alergenech.

Uchazečku bych požádal o vysvětlení následujících dotazů:

1) Vidí uchazečka rozdíl mezi potravinovou intolerancí a potravinovou alergií?
2) Jak si vysvětluje fenomén zkřížené alergické - atopické reaktivity (např. pyl břízy a jablko) když nejsou známy shodné aminokyselinové sekvence?
3) Existuje jiný než vysokoafinní receptor pro IgE a jestli ano, pak jakou má funkci?
4) Je možné použít stanovení celkového a specifického IgE v séru k posouzení atopické reaktivity případně k jejím změnám v průběhu léčby?
5) Vidí uchazečka praktické využití definování alergenních epitopů v diagnostických a léčebných postupech?

Závěr:

Předložená práce splňuje kriteria disertační práce. Uchazečka svými dosavadními pracovními výsledky nezpochybnitelně dokládá předpoklady pro další úspěšnou vědeckou činnost. Disertační práci doporučuji k obhajobě a navrhuji udělit Mgr. Barbaře Jankovičové titul PhD.

Doc. MUDr. Otakar Kopecký, CSc
Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Šimkova 870
Hradec Králové 1

V Hradci Králové 25.3.2011

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Strukturní analýza potravinových alergenů metodou mikrofluidní imunomagnetické separace

Mgr. Barbora Jankovičová

Disertační práce je psána klasickou formou přehledného (českého) textu s doprovodnými publikacemi (v angličtině). Členění práce je přiměřené, z celkového počtu 169 stran připadá 40 stran na teorii, 32 na experimentální část a 40 na výsledky a jejich diskusi. V přehledu literatury je uvedeno slušných 263 odkazů. Po formální stránce je třeba konstatovat, že text obsahuje minimum překlepů a je zřejmé, že jde skutečně o překlepy, nikoli o obsahové chyby (např. „velké dík" v úvodu nebo dvojvazný uhlík na obr. 27). Některé hodnoty jsou vyjádřeny na příliš vysoký počet platných číslic, např. enzymová aktivita v tab. 13 a zejména m/z píků v obrázcích MALDI MS spekter, kde je zapotřebí, aby označení píků odpovídalo kalibraci a použitému přístroji. Za poněkud redundantní považuji uvedení stejných příspěvků v kategorii sborníky a postery; i při vynechání první kategorie je bohatá aktivita doktorantky zřejmá.

Práce pojednává o aktuální problematice alergenů a klade si za cíl vyvinout metodu pro vyhledávání, izolaci a identifikaci jejich epitopů. Velmi srozumitelně a přehledně je popsána problematika alergie s veškerou odbornou terminologií i praktickými aspekty. Uveden je výčet technik, které jsou pro studium alergenů používány, relevantní metody jsou diskutovány podrobněji. Ze vzorků je detailněji pojednáno o ovalbuminu jako modelovém alergenu. V experimentální části jsou uvedena použitá zařízení a veškeré protokoly aplikovaných technik; nepamatuji se, kdy naposledy jsem četl tak pečlivě a detailně zpracovanou – a přitom obsáhlou – experimentální část. Pozornost je věnována chemickým principům (imobilizace, štěpení a s ním související úpravy), analytickým technikám (PAGE, izolace, MS), jakož i provedení izolace (vsádkové, mikrofluidní) a důkladné diskusi výsledků. Práce přináší množství nových poznatků a ve svém celkovém výsledku vedla k vyvinutí univerzální metody pro detekci imunogenních epitopů, příp. dalších klinicky významných molekul.

Barbora Jankovičová se podílela na třech publikacích v mezinárodních odborných časopisech a další tři publikace jsou připravovány; na jedné z vyšlých prací je uvedena jako první autorka se zásadním podílem na práci. Dále prezentovala výsledky své práce formou přednášek na schůzích a konferencích (5 anglických a 3 české přednášky) a je autorkou či spoluatorkou množství konferenčních posterů na domácích a zahraničních konferencích.

Vznesené připomínky nejsou zásadního rázu. Autorka zvládla sledovanou problematiku v teoretické i praktické rovině, seznámila se s celou řadou moderních analytických metod. Práce přináší cenné poznatky, velmi pozitivně hodnotím autorčin přehled, aktuálnost tématu i množství experimentální práce, které projekt jistě obnášel. Práce Barbory Jankovičové splňuje rozsahem, formou i obsahem nároky kladené na doktorskou disertaci a je mi potěšením ji doporučit k obhajobě.

V Brně 19. 4. 2011

Jan Preisler