

OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název práce: **Optimalizace dílčích kroků při vývoji elektrochemického imunosenzoru pro stanovení pepsinogenu A/C**

Autor práce: **Bc. Soňa Halbrštátová**

Vedoucí práce: **RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

Oponent: **RNDr. Eva Miarková, Ph.D.**

Předkládaná diplomová práce se skládá z teoretické a experimentální části. V teoretické části autorka vypracovala rozsáhlou a přehledně zpracovanou rešerši pojednávající o charakteristice, diagnostice a možnostech léčby karcinomu žaludku. Dále se zaměřila na kvantifikaci, strukturu a funkci pepsinogenů A a C a na možnosti použití magnetických mikročástic jako stacionární fáze pro imobilizaci protilátek. Ta ve spojení se specifickým antigenem a značenou sekundární protilátkou umožňuje elektrochemickou detekci a sestavení imunosenzoru pro včasné zachycení nádorových biomarkerů.

V experimentální a výsledkové části studentka připravila a charakterizovala specifické imunosorbenty imobilizací monoklonálních myších anti human PGA IgG, resp. polyklonálních slepičích anti human PGC IgY protilátek pomocí dvoukrokové karbodiimidové metody na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou. Dále připravila sekundární protilátky (králičí polyklonální anti porcine PGA IgG, slepičí polyklonální anti human PGA IgY a slepičí polyklonální anti human PGC IgY) konjugované s alkalickou fosfatázou, popř. s kvantovými tečkami. Úspěšně sestavila imunosenzory pro elektrochemickou detekci pepsinogenu A i C a prokázala jejich použitelnost i pro reálné vzorky pacientů.

Práce tímto splňuje stanovené cíle zadání. Rozsah diplomové práce je přiměřený, členění odpovídá významu jednotlivých částí. Odborná správnost je velmi dobrá, bez závažnějších připomínek. Práce je sepsána pečlivě a srozumitelně. Je v ní množství obrázků, které jsou detailně popsány. Popisky obrázků i tabulek jsou včetně zdroje, odkud bylo čerpáno. Přehled literatury je zpracován dle citačních norem. Jazyk práce, formální a grafická úroveň textu jsou velmi dobré, s pouze ojedinělými stylistickými neobratnostmi (např. str. 37 „a z velikosti charakteru interakcí se určují...“, str. 72 „vyizolovat“) či překlepy (např. str. 35 „s kvantovými tečky“, str. 36 „magnetických částice“). Velmi si cením podrobného sepsání experimentální části, které dovoluje opakovat experimenty i na jiném pracovišti.

Práce neobsahuje zásadní chyby či nedostatky. Některé drobné nepřesnosti, které jsem v textu našla, jsou formálního rázu:

Strana 68: „Využití slepic k produkci protilátek v širším měřítku zatím brání problematika izolace IgY ze žloutku, kdy IgY tvoří přibližně 5 % z celkové koncentrace proteinů žloutku a je součástí emulze žloutkových lipidů [82].“ Citace je z roku 2003 a není tedy zcela aktuální. Možná, že byly publikovány i další práce, než jen tato: Hodek, P., Trefil, P., Simunek, J., Hudecek, J., Stiborova, M.; Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. Int. J. Electrochem. Sci., 8, 113-124 (2013).

V práci hojně uvažujete účinnost vazby protilátek na magnetické partikule (např. str. 70, 76). Jakým způsobem dochází k vazbě protilátek při karbodiimidové reakci? Jde o vazbu orientovanou nebo neorientovanou? Je množství imobilizované protilátky dostatečným ukazatelem kvality imunosorbentu, nebo je třeba posuzovat i funkčnost imobilizované protilátky ovlivněnou např. sterickým bráněním či síťováním protilátek?

Dále mám na autorku následující dotaz:

Uvažovali jste při přípravě imunosorbentu pro afinitní purifikaci protilátek (polyklonálních slepičích anti human PGA IgY, polyklonálních slepičích anti human PGC IgY) druhovou specifitu protilátek použitých pro přípravu imunosorbentu? Viz str. 43 „magnetická perlová celulóza (Ústav makromolekulární chemie Akademie věd ČR) s imobilizovaným prasečím PGA (1. LF UK Praha, ČR) – 0,5 ml“

Druhá specifita protilátek nebyla zohledněna také při kvantifikaci lidského rekombinantního pepsinogenu A pomocí konjugátu s králičími polyklonálními anti porcine PGA IgG (str. 83). Pokuste se prosím vysvětlit, co pravděpodobně zapříčinilo, že protilátka reagovala s antigenem cizího živočišného druhu a jaký vliv na citlivost imunosorbentu to asi mělo.

Pokud je např. z ekonomických či etických důvodů nutné použít protilátku jiného živočišného druhu, co byste zohlednila při výběru alternativní protilátky?

Předloženou práci hodnotím jako velmi zdařilou, doporučuji ji k obhajobě a hodnotím výborně.

V Praze 20. 5. 2015



RNDr. Eva Miarková, Ph.D.