

Peter Dráber, Ph.D.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Václavská 1083

142 20 Praha 4

peter.draber@img.cas.cz**Oponentský posudek diplomové práce Bc. Ludmily Brázdilové nazvané ‚Vývoj opsonofagocytárního testu pro měření funkční aktivity protilátek proti *Bordetella pertussis*‘**

Předložená diplomová práce měla za úkol vyvinout tzv. opsonofagocytární test pro detekci imunitní odpovědi proti bakterii *Bordetella pertussis*. Tento patogen způsobuje vysoce infekční onemocnění černý kašel, proti kterému se standardně očkuje. Získaná imunita se však po několika letech od podání vakcíny umenšuje a proto je v současnosti snaha zavést nové typy vakcín a rovněž optimalizovat způsob, jak měřit specifickou imunitu proti této bakterii. Jedná se tedy o velmi důležitou a zajímavou tematiku.

Práce je psaná kvalitní angličtinou a po jazykové stránce je dobře srozumitelná. Je standardně rozdělena úvod, cíle práce, metody, výsledky, diskuzi a závěr. Literární úvod začíná popisem bakterie *Bordetella pertussis* a shrnuje základní virulentní faktory produkované tímto patogenem. Následně je racionálně vysvětlena nezbytnost přípravy nových funkčních testů, které by pomohly k lepší validaci nových typů vakcín. Následuje detailní přehled dosud publikovaných prací, které metodicky zavádí opsonofagocytární testy pro detekci některých patogenů a rovněž je zmíněno množství prací, které tento analytický test aplikují na bakterii *Bordetella pertussis*. V tomto jinak detailním úvodu mi chybí vysvětlení, proč dosud publikované metody pro opsonofagocytární testy na detekci imunitní odpovědi proti bakterii jsou nevyhovující a je třeba je modifikovat.

K samotné experimentální části mám určité výhrady. V práci jsou některé poměrně zbytečné figury a tabulky. Například je zbytečné ukazovat fotografii zkumavek po rozdělení krevních buněk na Percollovém gradientu v obr. 8 a 12, jedná se o běžnou metodiku. Rovněž není potřeba u každého FACSového měření ukazovat kompenzační matrix, obzvláště, pokud žádná kompenzace nebyla třeba, jak je tomu u tab. 11. Stejně není nutné u každého měření ukazovat všechny FACSové panely včetně toho, jak byly detekovány živé buňky a odfiltrovány buněčné agregáty. Jedná se o standardní metodiku analýzy a tyto detaily stačí popsat jednou v metodách. V některých Figurách jsou izolovány populace buněk, například neutrofilů nebo leukocytů. Ačkoliv je udáváno, že čistota izolovaných buněk byla velmi vysoká, nebyl použit žádný specifický marker na přesnou identifikaci těchto buněk,

vše je analyzováno pouze pomocí grafů ukazujících rozložení buněk na tzv. ‘forward scatter’ a ‘side scatter’ osách. V tomto případě by bylo potřeba barvit buňky dalšími povrchovými protilátkami, které by jednoznačně určily, zda se skutečně jedná o homogenní populace požadovaných buněk. U většiny prezentovaných experimentů není uvedena statistická analýza, která by stanovila zda jsou zmiňované rozdíly statisticky signifikantní. Rovněž není uvedeno, zda chybové úsečky pocházejí z nezávislých opakování, nebo zda se jedná pouze o analýzu technických opakování a také zda se jedná o směrodatnou odchylku nebo střední chybu průměru. Bez těchto údajů je komplikované vyhodnotit, zda pozorované rozdíly jsou skutečně relevantní.

Závěrečná díkuze přehledně shrnuje získaná data a autorka vhodně porovnává, jakým způsobem prezentovaná data souhlasí nebo rozporují dostupnou vědeckou literaturu. Vzhledem k tomu, že tato práce je zaměřena na vývoj metody by bylo vhodné více komentovat, zda prezentované experimenty skutečně vedly nebo mohou vést k zlepšení stávající metodiky a eventuálně jakým směrem by se měla další práce v této oblasti vyvíjet. Celkově je práce srozumitelná a přes výše uvedené výhrady ji doporučuji k obhajobě.

K práci mám následující otázky:

1. Závěrem práce je, že nejvhodnější buňky pro tento typ testu jsou leukocyty. O jaký typ leukocytů se specificky jedná, eventuálně jak by autorka určila jejich identitu?
2. Jaký je vliv protilátek versus komplementu při opsonizaci a fagocytóze *Bordetella pertussis*? Na obr. 23-24 se zdá, že inaktivace komplementu buď nemá vliv nebo snižuje opsonizaci bakterií pomocí myšího séra z infikovaných myší, zatímco ji výrazně zvyšuje u lidského séra. Naproti tomu ve obr. 26 tepelná inaktivace myšího séra zvyšuje opsonizaci bakterií i za použití séra z naivních myší. Jaký je důvod pro tyto rozdílné výsledky? Jakým způsobem je možné ověřit, že komplement byl v nepovařených sérech stále aktivní a nedošlo k degradaci vlivem mražení/skladování séra?
3. O kolik je výhodnější použití opsonofagocytárních testů oproti detekci specifických protilátek metodou ELISA? Z ukázaných výsledků v obr. 2 se zdá, že ELISA testy byly výrazně lepší v identifikaci protilátkové odpovědi.
4. Jaké je srovnání metodiky prezentované v této práci v porovnání s již publikovanou literaturou zabývající se opsonofagocytárnými testy? Přináší prezentovaná metodika přesnější výsledky?

3.9.2019 v Praze

Peter Dráber, PhD