

Oponentský posudek dizertační práce Ing. Lenky Hanouskové

„VYUŽITÍ IMUNOCHEMICKÝCH METOD V DIAGNOSTICE NÁDOROVÝCH A DEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ“

Předložená dizertační práce má celkově 105 stran textu, 6 tabulek a 36 obrázků, včetně abecedního seznamu zkratk. Informovaný souhlas pacientů je vždy uveden v rámci odstavce pojednávajícím o odběru vzorků v praktické části. Autorka v práci uvádí odkazy na 5 vlastních článků (z toho dvakrát jako první autor v časopise s IF) a 7 abstrakt ve sbornících (z toho třikrát mezinárodních). V práci je citováno 133 recentních publikací. Autoreferát má 41 stran formátu A5.

Práce byla vypracována na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie FN v Motole pod vedením doc. Ing. Karla Kotašky, Ph.D. Dizertační práce Ing. Hanouskové je napsána v českém jazyce.

Autoreferát je napsaný čtivě, přehledně a výstižně. Nicméně se zde objevila některá opomenutí, která se pak většinou objevují i ve vlastní dizertaci. Řada zkratk je bez vysvětlení (TIMP-1, SPINK-1, FGF23...), i když v dizertaci jsou uvedeny.

Spearmanův koeficient $< 0,3$ se obvykle považuje za slabou korelaci, což názorně ukazuje obr. 11 závislosti mezi koncentrací HK a osmolalitou (resp. obr. 36, s. 81 v dizertaci). Rozhodně se tedy nejedná o významnou korelaci.

Na s. 31 vypadl počet minut u biologického poločasu iFGF23 (také na s. 85 dizertace).

Stěžejní publikace autorky v Journal of Medical Biochemistry nevyšla v roce 2019, ale až v roce 2020. Takže správná citace má být 2020, vol. 39, no. 1, p. 108-111 a nikoliv 2019, vol. 38, no. 1, p. 1-4.

Dizertační práce má rozsáhlou teoretickou část, která se věnuje základním pojmům v imunochémii, imunochemickým metodám a biomarkerům, zejména se zaměřením na tři cíle dizertace, tj. indikátory karcinomu prostaty, primární hyperparatyreózy a gonartrózy kolene.

K definici imunochémie (s. 12) je vhodné dodat, že se zabývá také strukturou, biosyntézou a vlastnostmi imunoreaktantů.

Přehled imunometod je pojatý téměř encyklopedicky a v tom širokém, ale přitom stručném repertoriu se objeví občas některé nejasnosti. Např. je pravda, že haptén je příliš malý pro tvorbu precipitátu (s. 20), ale precipitát nevzniká hlavně proto, že samotný haptén není schopen imunoreakce a nevzniká imunokomplex, jak už bylo správně uvedeno dříve.

Heidelberger-Kendallová křivka je v řadě publikací nakreslena chybně a bohužel tomu tak je i v této práci (s. 20). Ve skutečnosti ani s obrovským nadbytkem antigenu neklesá k nule, např. při extrémních hodnotách HBsAg naměříme turbiditu na dva kříže.

PCR ELISA (s. 33) je poněkud složitější, než je uvedeno. Na amplikon značený dioxigeninem se naváže specifická protilátka značená POD nebo ALP a teprve po reakci s příslušným substrátem se provede fotometrická detekce.

Při popisu singletových a tripletových stavů (s. 34) by bylo správné mluvit o elektronech, a ne o atomech a molekulách.

Popis FPIA (s. 35) je nepřesný. Značený imunokomplex má pomalou rotaci a tedy vysokou polarizaci, zatímco malý značený antigen má rychlou rotaci a tedy nízkou polarizaci. Rozhodující je totiž doba natočení značky vůči polarizačnímu filtru.

TRACE (s. 36) umožňuje po excitaci donoru Eu nebo Tb (dusíkovým laserem nebo xenonovou výbojkou) přenos záření na akceptor (např. derivát alofykocyanin), jehož světelný signál se monitoruje.

V kapitole o interferencích je zmiňován hook efekt. Tento jev při nadbytku antigenu (s. 43) není pojmenován podle pana Hooka, ale vyjadřuje se tím ohnutím (hook) Heidelberger-Kendallový křivky.

V popisu biomarkerů je uvedena zkratka EGFR (s. 50), která není v seznamu zkratk.

Praktická část v úvodu popisuje přehledně postup při odběru vzorků, charakteristiku použitých analytických metod a aplikované statistické postupy.

Výsledky měření jsou dobře dokumentovány na 13 stránkách textu, obrázků a tabulek. Studie stanovení mindinu (s. 72) je zajímavá a výsledky by mohly být připojeny do tabulky 5, s. 68; i když byla tato studie provedena samostatně. Jedná se zřejmě o stejné vzorky, protože počet pacientů není u stanovení mindinu uveden. Při posuzování změn koncentrací vápníku a fosfátů (s. 77) by bylo vhodné upozornit na to, že se koncentrace pohybují stále v rámci normálních hodnot.

V diskuzi autorka analyzuje a vhodným způsobem diskutuje naměřené výsledky také s ohledem na jiné publikované práce. Z řady sledovaných biomarkerů karcinomu prostaty se ukázala vhodným zejména TK1. Epitop TK210 nebyl relevantní. Správně bylo upozorněno, že korelace jednotlivých parametrů závisí na způsobu klinického hodnocení (TNM vs. ISUP). Dalším výsledkem práce je sledování hladiny mindinu u pacientů s karcinomem prostaty. Při sledování pacientů s primární hyperparatyreózou byl analyzován biomarker FGF23 (hodnocen jak C-terminální, tak intaktní). Zasloučeně jsou diskutovány četné literární prameny, vliv dalších parametrů (PTH, vápník, fosfáty, vitamin D) a také uvedeny práce, které si vzájemně odporují (Kobayashi vs. Yamashita). Poslední část diskuze se zabývá využitím kyseliny hyaluronové při sledování pacientů s gonartrózou kolene. Autorka prokázala určitou korelaci hladiny kyseliny hyaluronové s osmolalitou, ale přístup k hodnotám Spearmanova koeficientu by měl být poněkud skeptičtější.

V kapitole Závěry jsou přehledně a srozumitelně formulovány dosažené výsledky, ze kterých je zřejmé splnění cílů práce.

Po formální stránce je práce napsána velmi kvalitně a drobná opomenutí a eventuální vysvětlující doplňky byly uvedeny výše. Oceňuji komplexnost práce, která je stručná, ale přitom hutná.

Závěrem lze konstatovat, že dizertační práce Ing. Lenky Hanouskové se zabývá aktuální problematikou klinického výzkumu a splňuje požadavky doktorské dizertace, neboť přináší celou řadu nových poznatků, ověřených publikací v impaktovaných časopisech. Autorka je schopna kriticky posoudit dosud dosažené výsledky ze světové literatury a porovnat je s vlastními závěry. Mohu konstatovat, že Ing. Lenka Hanousková prokázala schopnost samostatné vědecké práce.

Dle výše uvedených skutečností doporučuji, aby byl Ing. Lence Hanouskové na základě úspěšné obhajoby dizertační doktorské práce udělen titul Ph.D.

Otázky k obhajobě

1. *Jak byste vysvětlila, že stanovení koncentrace TK1 má vyšší diagnostický význam než stanovení její katalytické aktivity?*
2. *Některé vzorky byly uchovávány při -70 °C (s. 60), zatímco jiné při -80 °C (s. 66), proč?*
3. *Rozlišení sérových hladin TK1 u pacientů s méně závažnými a závažnými tumory je pozorovatelné? V diskuzi uvádíte (s. 82) rozdílné hodnoty pro P. Místo společného krabicového grafu (s. 69) by bylo zajímavé ukázat, jak vypadají krabicové grafy obou uvedených skupin.*