

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Studijní program: Farmacie

**Posudek oponenta diplomové práce**

Rok obhajoby: 2023

Autor/ka práce: **Petra Grossová**

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Konzultant/ka:

Oponent/ka: PharmDr. Jiří Demuth, Ph.D.

Název práce: **Příprava konjugátů oligonukleotidových sond s funkčními molekulami**

Rozsah práce: 60 stran, 10 obrázků, 10 tabulek, 76 citací

**Hodnocení práce:**

- |  |             |
|--|-------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části:               | výborná     |
| b) Náročnost použitých metod:                                  | výborná     |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost):   | velmi dobré |
| d) Kvalita získaných experimentálních dat:                     | výborná     |
| e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost):          | velmi dobré |
| f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy:              | velmi dobré |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků:                | velmi dobrá |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů:            | velmi dobrá |
| i) Splnění cílů práce:   | výborné     |
| j) Množství a aktuálnost literárních odkazů:                   | výborné     |
| k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň):          | velmi dobrá |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | velmi dobrá |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Předkládaná diplomová práce se zabývá efektivitou značení oligodeoxynukleotidového řetězce imobilizovaného na pevné fázi pomocí komerčně dostupného fluoroforu Cy5. Práce má klasické členění, kde v Teoretické části jsou popsány syntéza, možnosti purifikace a značení oligodeoxynukleotidového řetězce, popis rodiny cyaninových barviv a princip "click chemie", která je využívána během diplomové práce. Experimentální část je dělena na Metodiku a Výsledky. Samotné experimentální úkony studentky se skládaly z velkého množství opakování jednotlivých metodických postupů, tudíž studentka přistoupila k podrobnějšímu popisu experimentů až v kapitole 4.2 Výsledky, kde se vždy odkázala na podkapitolu Metodiky. Následují hlavní kapitoly Diskuze, Závěr, Seznam citované literatury a Přílohy. Nicméně informace v kapitole 4.2 Výsledky, kde je například formou grafů ukázána efektivita značení oligodeoxynukleotidového řetězce pomocí Cy5, následně chybí v kapitole Diskuze a čtenář musí horlivě listovat, aby si mohl udělat ucelený obraz, čímž se tato důležitá sekce diplomové práce stává nepřehlednou. V samotném Závěru jsou obecně shrnuty nejlepší podmínky pro postsyntetické značení oligodeoxynukleotidových řetězců. Jednotlivé zdroje použité při sepisování této práce jsou řádně ocitovány. V práci se ale vyskytuje řada typografických chyb a překlepů.

Dotazy a připomínky:

Připomínky: (netřeba reagovat)

Str 7 a 8 - V abstraktech je Mgr. Beranová uvedené jako konzultantka, ale v SISu to tak není a tyto informace by se měly shodovat.

Str 9 - V seznamu zkratek by mohla být asi jen polovina uvedených zkratek, protože ostatní se v textu vyskytují jednou maximálně dvakrát -> velký počet zkratek dodává textu na nepřehlednosti. Dále jsou použity dvě zkratky pro ten samý postup SEC/GPC. Napříč celou prací jsou používány zkratky bez toho, aby byly zavedeny v textu.

Str 18 - Ve větě: Proces je řízen z počítače a lze kontrolovat přes kontrolní panel. ....vypadlo zájmeno ho.

Vzorci v práci mají rozdílnou velikost.

Str 19 - u obrázku prohozeny popisky pro b) a c).

Str 29 - BODIPY jsou borondipyrromethene nikoliv borondipyrromethane.

Str 35 - Seznam chemikálií/přístrojů - uvedené informace by měly být jednotné - někde se vyskytuje i město, kde je sídlo firmy a někde jen stát.

Str 37 - Obrázek 10 - ilustrace jednotlivých pevných fází je matoucí, člověk špatně poznává, co je co?

Str 41 - Graf 2 - absorpční pásy jsou charakterizované svými maximy, což je jedna vlnová délka pro dané maximum. Výraz pás v okolí 650 nm nezní moc odborně.

Grafy 9, 10, 11 by měly být s chybovými úsečkami. Najednou zavedena nová zkratka PS místo HCLPS.

Přílohy - Některé tabulky obsahují vysvětlivky a jiné nikoliv. Je divné počítat průměr z jedné hodnoty.

Dotazy:

Str 10 - Znamená opravdu zkratka MALDI-TOF to, jak jí vysvětlujete?

Str 11 - Jaký je správný název pro zkratku TEAA?

Str 17 - Co znamená zkratka LCAA v popisku obrázku?

Str 18 - Vysvětlete výraz ve formě frit ve větě: V případě automatizované syntézy v DNA/RNA syntetizéru je pevná fáze ve formě frit ukotvena v kolonkách nebo jamkových destičkách, díky čemuž jsou umožněny i následná deprotektce a čištění.

Str 18 - Jaký je rozdíl mezi vodným roztokem amoniaku a roztokem hydroxidu amonného?

Str 20 - Věta: Výběr závisí na délce řetězce, scale syntézy a účelu použití oligonukleotidu. Použití slova "scale" v českém textu není zcela vhodné, čím byste ho nahradila?

Str 21 - Porovnáváte princip purifikace na kolonce s reverzní fází versus RP-HPLC - v čem se tedy principy shodují a v čem naopak liší?

Str 22 - Jaký je hlavní rozdíl mezi sekvenováním a MS, co se týká charakterizace?

Str 23/24 - Na první pohled vypadají baze na obrázcích 5 a 6 stejně - proč se jednou hovoří o uracilu a jednou o thyminu?

Str 25 - Obrázek 7 - Přes jakou vazbu jsou vázány chránící skupiny na tomto obrázku, protože to není vyznačeno.

Str 39 - Píšete, že bylo připraveno 200 uL roztoku Cy5 o koncentraci 100 mM a daný roztok byl používán opakovaně -> Byl roztok mezi jednotlivými reakcemi filtrován? Do poslední (4.) reakce jste rozhodně nemohla přidávat 200 uL - jak to tedy bylo?

Str 39 - Kapitola Deprotekce - píšete, že čirý THF byl odpipetován z vialky a poté odpařen na vzduchu je to přesné vyjádření? (co z čeho bylo odpařeno)

Str 39 - Kapitola Čištění - píšete, že celý obsah vialky byl po deprotekcii přenesen na gelovou kolonku - tudíž byla dávána na kolonku i pevná fáze?

Str 39 - Kapitola Příprava vzorků na analýzu - specifikace podmínek odpaření jsou správně jednotlivé fyzikální veličiny a jednotky ( $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $p = 500\text{ kPa}$ ,  $T = 6\text{ h}$ )?

Str 40 - Při jaké teplotě probíhala Vaše metoda, jaký byl objem nástřiku?

Str 41 - Chromatogram 1 Sledovali jste obsah toho, co je i v dalších píicích - třeba při cca 4,3min)? Je hodnocení efektivity "click reakce", kdy sledujete pouze poměr značeného a neznačeného oligodeoxynukleotidu, správné - nezvyšujete si tím uměle výtěžnost?

Str 42 - Chromatogram 2 + Graf 3A - na grafu znázorněné absorpční spektrum mi přijde jako téměř šum pozadí - zkoušela jste porovnat tvar absorpčního spektra i jiných retenčních časech (třeba 5 a 9 min) s časem 6,095min?

Str 44 - Jaká byla použita teplota pro deprotekcii ?

Str 52 - Píšete, že se bude Vámi optimalizovaná metoda převádět na syntetizér - už to proběhlo?

Str 52 - Píšete, že z absorpčních spekter bylo možné rozlišit oligodeoxynukleotidové řetězce bez DBCO, můžete uvést jak to lze ze spektra poznat (ideálně na spektru)?

Přílohy - čím si vysvětlujete diametrálně rozdílné celkové AUC mezi jednotlivými opakováními, kde rozdíly jsou klidně dvoj- či třínásobné?

Kontrola plagiátorství ukázala shodu 4 % (Theses) a 18 % (Turnitin), nicméně shodné pasáže jsou pouze povinné formulace a ojedinělé slovní spojení. Tudíž lze předkládanou práci považovat za originální.

**hodnocení, práce je: velmi dobrá**

**k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové

7. září 2023

podpis oponenta/ky