

Název rigorózní práce **Vývoj HPLC metody pro monitorování přípravy oligodeoxynukleotidových sond**

Uchazeč **Mgr. Tomáš Šemlej**

Oponent **PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.**

Posudek oponenta rigorózní práce

Mgr. Tomáš Šemlej předložil rigorózní práci, která je zaměřena na výběr vhodné stacionární fáze pro chromatografickou separaci dvojité a jednoduše značených oligodeoxynukleotidů. Dále na využití optimalizované HPLC metody s UV detekcí pro monitorování výsledků přípravy jednoduše značených sond a zároveň pro hodnocení jejich post-syntetické modifikace.

Práce je členěna obvyklým způsobem, má 83 stran včetně souhrnů v českém a anglickém jazyce. Je doplněna 6 tabulkami, 41 obrázky. V práci je citováno 108 pramenů. Práce je zpracována s minimálním počtem překlepů.

Protokol o vyhodnocení podobnosti závěrečné práce v Theses.cz našel 12 podobných dokumentů, nejvyšší hodnota shody je u dvou dokumentů 4 %, kde je shoda pouze v krátkých úsecích teoretické části. Turnitin našel 24% podobnost, u většiny dokumentů jde o podobnost menší než 1 %, jen jeden dokument uvádí 2 %, ale jedná se prohlášení a poděkování studenta a název fakulty. Veškeré nalezené shody jsou bezvýznamné.

K práci mám tyto dotazy a připomínky:

Nejdříve obecná připomínka, jedná se o analytickou práci, ale přibližně 80 % teoretické části je zaměřením spíše farmaceutická chemie resp syntéza. Tomu odpovídá i příslušnost uvedené literatury. Určitě chemická část by šla zkrátit a analytická rozšířit o vlastnosti popř. aplikace testovaných kolon. U některých kolon jsou charakteristiky krátce zmíněny v kap. 5 Výsledky a diskuse, kam úplně dle mého názoru nepatří např. str 54, kde však chybí i citace. Další připomínkou je koncepce obrázků resp chromatogramů v experimentální a výsledkové části. Pro tištěnou verzi jsou obr 29-35 včetně jejich popisu malé. Naopak na obr. 40 jsou chromatogramy názorně a přehledně uvedené, což by slušelo i obr. 39 a 41., kde např. růžový chromatogram zaniká v oblasti píku při Rt 6 min.

Dále konkrétní dotazy:

str 10 2. odst překlep obtížně a v následujících 2 větách je změněn vid.

str 12 kap. 2.1.1 věta ..Jak již samotný název napovídá, syntéza se odehrává na pevné fázi. v kontextu odstavce postrádá smysl o pevné fázi jsou již 3 předcházející věty.

str 34 posl odst uvádíteviditelnou a infračervenou oblast (300–800 nm), bylo to takhle opravdu v literatuře uvedeno?

str 45 standardy 2,3 na 3' konci řetězce značka Q30 - o co se jedná, není v práci nikde uvedeno ani v seznamu zkratk

str 50 příprava pufrů TEAA připravena ředěním 2M roztoku, jak se připravoval a jakou měl stabilitu?

str 51, 52 obr 29 odkazuje na isokratickou eluci S1, ale v popisu na str 51 je uvedený pouze gradient.

str 58 Ale pík značeného oligodeoxynukleotidu se objevilvhodnější sloveso

Dotaz k přísadce NH4F, jaký efekt se očekával?

str 60 na závěr shrnutí kap. 5.1 by bylo vhodné vložit přehled resp chromatogram pro sledované standardy v jednom chromatogramu pro všechny testované stac. fáze. např jako obr 40, bylo by to přehlednější než listování resp rolování.

str 60 a 62 rozpor mezi textem v předposl odst a obr 34...Vlivem vyšší koncentrace TEAA došlo k prodloužení retenčního času ...u c 25 mM došlo naopak ke zkrácení

Dále k obr 34, zda bylo zvláštní chování S2 S3 při vyšší teplotě zopakováno a potvrzeno?

str 63 Jak rozdílná kolona byla používána v DP Mgr. Sčesné, bylo by vhodné to při srovnávání také uvést.

str 67 obr 37 Neuvažoval jste resp. nezkoušel zvýšení gradientu až na 95% AcN, aby se S4 eluoval dříve

a možná méně chvostoval?

Poslední dotaz se týká osvětlení proč u standardů s FAM značením při výběru stac. fáze nebyl testován i TRIS pufr, když se osvědčil v DP Mgr. Ščesné jak píšete na str 51.

V práci bylo provedeno velké množství experimentů a vyvinuté metody budou určitě přínosné pro separaci dvojitě a jednoduše značených sond oligodeoxynukleotidů a monitorování jejich přípravy a post-syntetické modifikace. Závěrem chci konstatovat, že tato rigorózní práce Mgr. Tomáše Šemleje SPLŇUJE požadavky na takovéto práce kladené, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Hradec Králové, dne 9.11. 2023

Podpis oponenta rigorózní práce