

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Autor/ka práce: **Barbora Kovářová**

Vedoucí/školitel/ka práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Rok obhajoby: 2017

Konzultant/ka práce: Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Manfred Ogris

Oponent/ka práce: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Název práce:

Reporter gene studies for nanoparticle mediated DNA and siRNA delivery

Rozsah práce: počet stran: 97, počet obrázků: 33, počet tabulek: 10, počet citací: 51

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: výborná
- c) Zpracování teoretické části: výborné
- d) Popis metod: výborný
- e) Prezentace výsledků: velmi dobrá
- f) Diskuse, závěry: výborné
- g) Teoretický či praktický přínos práce: velmi dobrý

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení: V předložené diplomové práci vypracované v rámci projektu ERASMUS se autorka věnuje testování transfekčních schopností několika nanostrukturovaných materiálů. Práce je psána v anglickém jazyce, je logicky členěna, má vysokou úroveň jazykové úpravy a vyskytuje se v ní pouze minimum překlepů a nesprávných gramatických formulací. Metodický a experimentální rozsah práce je nadstandardní. Celková úroveň práce je vysoká, škoda jen, že většinu výsledků tvoří výsledky negativní a že nebylo více času pro zopakování některých experimentů. Po obsahové ani grafické stránce k práci nemám žádné zásadní výhrady, mám pouze několik připomínek a dotazů.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

- 1) Věta "For example, siRNA and ODNs activity takes place in cytosol, whereas DNA needs to get to the nucleus." (str. 17) je zavádějící. Antisense oligodeoxynukleotidy jsou z definice také DNA, termín DNA ve větě by proto měl být nahrazen výrazem jako např. "expression vectors".
- 2) V práci jsou využívány linie s vysokým číslem pasáže. Z vlastní zkušenosti vím, že transfektabilita některých linií výrazně klesá s časem, který stráví v kultuře. Doporučil bych používání linií s nižším číslem pasáže.
- 3) Příprava kalibrační řady pro stanovení proteinů byla prováděna metodou přidávání příslušného množství roztoku BSA do daných koncentračních bodů. Vhodnější je metoda postupného ředění, která je přesnější. Navíc byla zvlášť přidávána voda a zvlášť 2x PLB, což opět snižuje přesnost provedení. Doporučil bych přípravu kalibrační řady přímo v roztoku 1x

PLB. Nejvíce nelogické je nastavení koncentrací standardu do objemu 25 ul. Kvůli tomuto nastavení bylo nutné k 20 ul buněčného lyzátu dopipetovávat 5 ul MQ vody pro sjednocení objemu. Snazší i přesnější je nastavit si koncentrace standardu do objemu shodného s testovanými vzorky (20 ul).

4) Achillovou patou prakticky všech polymerních i liposomálních transfekčních agens je přímá korelace mezi množstvím agens, jeho transfekční účinností a cytotoxicitou. Z několika grafů prezentovaných v práci je zřejmé, že koncentrace testovaných agens je cytotoxická. Doporučil bych nejprve otestovat cytotoxicitu testovaných materiálů pomocí vhodného testu (neutral red, LDH atd.) a výsledky těchto experimentů zohlednit při transfekci. Ačkoliv je možné cytotoxicitu odhalit pomocí stanovení proteinů, které bylo prováděno, normalizace dat má svá omezení a vždy je lepší testovat za podmínek, které nejsou cytotoxické.

5) S předchozím komentářem souvisí i nejednotnost metody vyhodnocení, kdy v práci jsou používány 3 různé metody vyhodnocení bez jasné návaznosti. Osobně bych měl při tomto přístupu obavu o porovnatelnost získaných výsledků.

6) U některých grafů chybí pozitivní kontrola ve formě transfekce pomocí komerčního transfekčního reagens, která slouží jednak pro kontrolu skutečnosti, že buňky jsou transfekovatelné a také pro porovnání transfekční potence testovaných vzorků. Bez této kontroly bych si nedovolil interpretovat data.

Dotazy:

1) Na předchozí komentář navazuje otázka týkající se pozitivní kontroly. U několika grafů je zřetelná velmi omezená nebo dokonce žádná transfekční účinnost Lipofectaminu, který v práci slouží pro tento účel. Optimalizovali jste nějak transfekční podmínky pro pozitivní kontrolu?

2) Existují mimo PEI modifikací i jiné modifikace zlatých nanočástic používaných pro transfekce? Je známa farmakokinetika a biokompatibilita zlatých nanočástic?

Celkové hodnocení, práce je: výborná, k obhajobě: doporučuji

V Hradci králové dne 22.5.2017

.....
podpis oponentky / oponenta