

# POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název práce: Optimalizace podmínek izolace miRNA z biologického materiálu pomocí TiO<sub>2</sub> mikrosfér

Autor práce: Bc. Adéla Stýblová

Akademický rok: 2020/2021

Oponent: PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.

Studentka Bc. Adéla Stýblová vypracovala diplomovou práci na Katedře biologických a biochemických věd FCHT UPa formou experimentální práce. Práce je konvenčně členěna na teoretickou část, experimentální část, výsledky s diskuzí a závěr.

Teoretická část je sepsána na 43 stranách. Autorka v ní vysvětluje základní principy přenosu genetické informace a postupně se dostává k popisu jednotlivých typů RNA. Tuto část považuji za hodnotnou vzhledem k tomu, že právě oblast nekódujících RNA prochází velmi dynamickým vývojem, a v této práci jsou jednotlivé typy i role těchto RNA pěkně shrnuty.

V dalším bloku teoretické části se výklad zaměřuje na izolaci nukleových kyselin. Přehled zahrnuje nejčastější způsoby izolace – fenol-chloroformová extrakce a extrakce na pevné fázi včetně stále se rozšiřujících magnetických separací. Přehled zahrnuje nejen popis postupů, ale i vysvětlení mechanismů jednotlivých metod. Vzhledem k tomu, že tento výklad je nejbližší zaměření experimentální části, bylo by žádoucí zaměřit se detailněji na problematiku související s adsorpcí nukleových kyselin na pevnou fázi, neboť v práci jsou jí věnovány pouze tři strany textu. V této části autorka nesprávně používá termín „silikonové“ tam, kde pravděpodobně v anglických zdrojích bylo použito termínu „silica“, což je označení oxidu křemičitého a nikoli silikon.

Na závěr se v teoretické části věnuje různým způsobům detekce nukleových kyselin. Zmíněny jsou gelová elektroforéza, Northern blot, PCR, Mikročipy a hmotnostní spektrometrie. Opět i v této části bych ocenil větší akcentování problematiky, která pak provází experimentální část, tzn. gelovou elektroforézu a detekci nukleových kyselin po elektroforéze.

V teoretické části oceňuji, že až na výše uvedené výtky je výklad srozumitelný, obsahuje velmi málo překlepů a gramatických chyb a v textu se nevyskytují pozůstatky krkolomných automatických překladů.

Experimentální práce obsahuje popisy vstupních materiálů pro jednotlivé experimenty a popis využitých metod. Výsledky jsou ve společné kapitole s diskuzí. Popis experimentů je detailní a pouze doporučuji jednoznačnější odkazování v kapitole Výsledky na metody vyjmenované v Experimentální části. Ve výsledcích jsou postupy zmiňovány také a čtenář si musí skládat představu o podmínkách experimentu z informací uvedených ve dvou kapitolách.

V práci byly kromě izolace na částicích TiO<sub>2</sub> využity zejména elektroforetická separace na polyakrylamidovém gelu s fluorescenční detekcí a metoda real-time PCR. Autorka ve své práci prokázala, že materiály složené z TiO<sub>2</sub> mají potenciál pro izolaci nukleových kyselin. Velký vliv má uspořádání izolačního postupu a složení reagensů. V průběhu práce byly zoptimalizovány doba inkubace částic s lyzátem, lyze buněk a podmínky pro vazbu miRNA na částice. Výsledky získané pomocí metody PCR byly získány s nevhodně zvolenou kalibrační řadou standardů (viz doplňující otázky

bod 4). Po těchto optimalizačních krocích se nabízí porovnání zoptimalizované metodiky s konvenčními přístupy pro izolaci miRNA na reálných vzorcích, to ale v bohužel v práci chybí.

Citováno je celkem 245 zdrojů, z nichž většina jsou původní práce v anglicky psaných recenzovaných časopisech. Bibliografické údaje jsou zpracovány obvyklou formou a svým rozsahem odpovídají požadavkům na tento typ práce. Práce je napsána na 123 stranách. Vlastní text bez obsahu, anotace a seznamu zkratk je na 83 stranách a obsahuje cca 134 tis. znaků. Práci ilustruje 26 obrázků, z nichž 15 bylo převzato z literatury a ilustruje teoretickou část, zbývající jsou součástí výsledků. V experimentální části jsou dále 2 grafy. Tři z celkových 12 tabulek je součástí teoretického výkladu, zbývajících 9 tabulek dokumentuje experimentální výsledky.

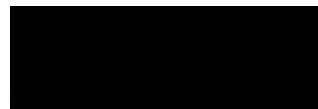
Doplňující otázky:

- 1) Výčet potenciálních biomarkerů je v teoretické části velice rozsáhlý. Zejména se jedná o biomarkery typu miRNA, které jsou výsledkem lékařského výzkumu poslední dekády díky rozšíření technologií sekvenování nové generace. V praxi se tyto biomarkery bohužel neuplatnily v širší míře. Mohla byste prosím vyjmenovat obtíže, které provází rozsáhlejší aplikaci tohoto typu biomarkerů do praxe?
- 2) na str. 41 je guanidium thiokyanát označen jako detergent. Není to správná klasifikace, neboť se jedná o chaotropní činidlo. Mohla byste vysvětlit pojem chaotropní činidlo a popsat jeho roli v izolačních procesech nukleových kyselin?
- 3) Většina výsledků v práci byla získána pomocí elektroforetické separace na polyakrylamidovém gelu a následnou denzitometrickou analýzou fluorescence. V práci se vyskytují výsledky, kdy relativní obsah převyšuje 100% (např. v Tabulce 7 u 2% SDS nebo v Tabulce 8 součet frakcí bez SDS, bez GuSCN). Jak vysvětlíte tyto výsledky? Byly před využitím metody denzitometrického stanovení nastaveny nejistoty stanovení?
- 4) Na str. 92 jsou uvedeny výsledky z kvantitativní PCR. Naměřené Ct hodnoty jsou mimo rozsah kalibrační přímky a kvantifikace u takto vysokých koncentrací je pak zatížena příliš vysokou chybou. Z elektroforetických separací navíc bylo zřejmé, že obsah miRNA v analyzovaných frakcích bude cca v desetinách pmol/ $\mu$ l, ale kalibrační přímka pro PCR má bod s nejvyšší koncentrací o 2 řády nižší, než je očekávaná koncentrace vzorku. Můžete prosím vysvětlit, proč jste takto postupovala?

Práce svým rozsahem odpovídá formálním požadavkům kladeným na diplomovou práci. Zadání práce bylo splněno a cíle byly dosaženy. I přes výše zmíněné nedostatky ji

**doporučuji k obhajobě a hodnotím známkou B.**

V Hradci Králové 24. 8. 2021



PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.