

Oponentský posudek diplomové práce Jany Zavázalové „Studium redukční aktivace environmentálního polutantu a karcinogenu 3-nitrobenzanthronu“

Diplomová práce Jany Zavázalové řeší zajímavou a z biomedicíálního hlediska i velmi důležitou problematiku aktivace chemických karcinogenů na ultimální karcinogeny, které jsou zodpovědné za modifikaci genetické informace a tím i za vznik nádorového bujení (konkrétně se v tomto případě jednalo o redukční aktivaci 3-nitrobenzanthronu). Předkládaná diplomová práce byla vypracována jako součást dvou grantových projektů, jmenovitě GAČR číslo 303/05/2195 a MŠMTČR číslo MSM0021620808.

Z diplomové práce je patrné, že se autorka zhostila řešení zadané problematiky úspěšně. Jana Zavázalová se seznámila s řadou technik, které se při práci v biochemické laboratoři často používají (inkubace substrátu s enzymovým systémem, chromatografické techniky se zaměřením na HPLC a v neposlední řadě také spektrofotometrie). Pod odborným vedením Doc. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. pronikla Jana Zavázalová také do základů přenosových technik proteinů („Western blotting“) s imunochemickou detekcí. Výsledky předkládané práce odpovídají jejímu zadání a budou využity, jako výchozí materiál pro další výzkum v této oblasti. Autorka prokázala, že karcinogenní 3-nitrobenzanthron je redukován jednak lidskou rekombinantní DT-diaforasou, ale také potkaním jaterním mikrosomálním systémem. Dále našla optimální podmínky pro sledování dané reakce. Jako nejdůležitější přínos této práce hodnotím popsání vlivu 3-nitrobenzanthronu na expresi a aktivitu cytochromů P450 1A1 a 1A2 v premedikačních experimentech na modelovém organismu (laboratorní potkan).

Po formální stránce je práce členěna obvyklým způsobem, vyhovujícím pracím obdobného charakteru.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Nejprve několik formálních připomínek:

a/ Strana 5 je chybně vložena, je totožná se stranou 2. V důsledku této chyby byly zřejmě vynechány některé zkratky, které autorka v textu hojně používá (3-NBA, NQO1, RP-HPLC atd.)

b/ Na straně 36 je kapitola 3.3.7 nazvaná „Studium vazby 3-NBA aktivovaného jaterním mikrosomálním systémem na proteiny“. V textu se však uvádí, že 3-NBA byl aktivován DT-diaforasou pro účely tohoto experimentu. Jaký enzymový systém byl tedy ve skutečnosti použit? Prosim opravte tento překlep ve Vaší práci.

c/ Na straně 42 je odkaz na podmínky HPLC experimentu uvedené v kapitole „Materiál a metody“. Nicméně chybí doplnění dané kapitoly, tedy konkrétně 3.3.5.1, je jen vynechané prázdné místo.

d/ Na straně 56 na obrázku 25 je chybně uvedena osa y.

2. V kapitole 1.5.1. na straně 25 je uvedeno, že „genotoxicita 3-BNA byla prokázána v řadě testů na mutagenitu“. Můžete prosím jmenovat a vysvětlit podstatu alespoň jednoho takového testu?
3. Dále by mně zajímalo, jak si vysvětľujete výsledky experimentu uvedené na obrázku číslo 13 (strana 44). Při koncentraci DT-diaforasy 5 µg/ml je množství produktu (3-ABA) větší než množství spotřebovaného substrátu (3-NBA).
4. Z jakého důvodu jsou v grafech 13, 14 a 15 jednotky přeněšeného 3-NBA a vzniklého 3-ABA v nmolech, zatímco v grafech 16, 17, 18 a 19 jsou jednotky jen relativní (plochy píků)?
5. Jak si vysvětľujete fakt, že jste při redukci 3-NBA ani DT-diaforasou ani jaterními mikrosomy nedetekovala předpokládaný proximální karcinogen 3-nitrobenzanthronu, tedy příslušný N-hydroxylamin? V obou Vámi studovaných systémech jste detekovala pouze finální produkt redukce tj. 3-ABA.

Diplomovou práci Jany Zavázalové podle mého názoru splňuje požadavky kladené na práci tohoto typu. Proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze, 14. 5. 2007

RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

klasifikace: výborně