

Téma diplomové práce	Stanovení oxidativního poškození DNA pomocí jednobuněčné gelové elektroforézy (Kometový test)
Jméno studenta, studentky	Věra Škubalová
Jméno oponenta	Mgr. Jana Slyšková

II. Posudek oponenta

Diplomová práca Věry Škubalovej je orientovaná do problematiky detekcie oxidatívneho poškodenia DNA. Práca sa zaobera metodologickým prístupom ku stanoveniu oxidatívneho poškodenia pomocou jednobunkovej gélovej elektroforézy (kometového testu). Práca je predložená v rozsahu 51 strán a obsahuje 5 grafických vyobrazení výsledkov.

V teoretickej úvodnej časti práce autorka uvádza stručný prehľad mechanizmov mutácií, vzniku poškodenia DNA v dôsledku oxidačných pochodov v bunkách a mechanizmov ochrany bunky proti týmto oxidačným reakciám. V teoretickej časti sa autorka zameriava aj na terorecké základy metód stanovenia poškodenia DNA s ohľadom predovšetkým na poškodenie oxidatívne.

V metodickej časti je podaný podrobny popis princípov kométového testu a stanovení oxidatívneho poškodenia pomocou modifikácie metódy s využitím špecifických enzymov štepiacich špecifické lézie DNA, ako napríklad oxidované pyrimidiny a oxidované puríny.

Ve výsledkovej časti autorka uvádza najskôr výsledky stanovenia oxidatívneho poškodenia DNA u menšej skupiny zdravých jedincov. I na takto malom súbore už bolo patrné, že oxidatívne poškodenie je pomerne variabilné i u zdravých ľudí. Veľká variabilita oxidatívneho poškodenia sa ukázala aj u ľudí exponovaných profesionálne butadiénu. Veľmi zaujímavé sú aj výsledky stanovenia oxidatívneho poškodenia u buniek HeLa následne po ich ožiareni UVC. Hoci u takto ožiazených buniek je možné kometovým testom detektovať v kombinácii s endonukleázou predovšetkým pyrimidinové dimery, dochádza aj k indukcii oxidovaných báz. Je zaujímavé, že tieto oxidované bázy sú detektované za 3 h. po ožiareni.

Prínosy práce autorka vyhodnocuje v pomerne stručnej, metodicky zameranej diskusi.

Autorka sa dobre zhstila pomerne náročnej metodickej úlohy a podarilo sa jej spracovať a vyhodnotiť oxidatívne poškodenia indukované experimentálne, a tiež poškodenia u ľudí, vniknuté spontánne, či v dôsledku expozície cudzorodým látkám. Práca vyzkazuje nespornú metodickú náročnosť, jej výsledky prinášajú skôr metodický pokrok v sledovaní poškodenia DNA. Z toho aj možno vyplýva pomerka stručná diskusia, ktorá, podľa môjho názoru mohla byť obsiahlejšia.

Rada by som položila autorke túto otázku: na obr. č. 5 je patrné, že endo III miesta sa objavujú v DNA až za 2-3 hodiny po ožiareni. Ako si tento nález autorka vysvetluje?

Autorka jednoznačne preukázala svoju schopnosť samostatne riešiť náročnejšie metodické zadania a správne vyhodnotiť aj výsledky týchto štúdií. Z týchto dôvodov prácu doporučujem k obhajobe.