

Oponentský posudek

Dizertační práce:

Využití kometového testu při měření integrity DNA v klinice a aplikovaném výzkumu.

Autorka práce : Mgr. Yana Bagryantseva, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze.

Oponent: prof.RNDr. Rudolf Štětina, Csc., Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové, Česká Republika.

Dizertační práce Mgr. Yany Bagryantsevové má rozsah 110 stran, z toho 76 stran vlastního textu včetně citací, a je doplněna kopiemi čtyř publikovaných vědeckých článků.

Práce je rozdělena do obvyklých kapitol. V literárním úvodu je velmi detailně podána charakteristika kometového testu a jeho využití, a to způsobem, který jasně svědčí o autorčině teoretické připravenosti k řešení daného tématu. V metodické části je uveden detailní popis použitých metod. Popis výsledků je jasný a srozumitelný. V práci je začleněna velmi kvalitní diskuze k souboru přiložených prací. V této diskusi autorka přesně a kriticky hodnotí své výsledky a uvádí je do kontextu se současnou úrovní poznatků v řešené problematice.

Z obsahu práce je zřejmé, že byla vypracována na předním vědeckém pracovišti zabývajícím se danou problematikou, a že tato práce byla součástí řešení prestižních vědeckých úkolů řešených na školícím pracovišti.

Autorka v práci uvádí v podstatě tři konkrétní cíle směřované do oblasti hematologie, biomonitoringu a oblastí využití kmenových buněk v terapii poškození centrálního nervového systému. Osou všech tří cílů je však využití kometového testu jakožto metody pro sledování poškození DNA. Jedná se o sledování poškození DNA v průběhu onemocnění myelodysplastickým syndromem, poškození DNA u jedinců exponovaných mutagenům v ovzduší a konečně poškození DNA indukované u kmenových buněk izolovaných z kostní dřeně působením superparamagnetických nanočástic.

První část práce se zaměřuje na možnosti využití kometového testu pro sledování poruch krvetvorby u pacientů s méně pokročilými subtypy myelodysplastického syndromu. Práce publikované autorkou na toto téma ukazují, že v buňkách kostní dřeně pacientů s refrakterní anémií (RA) vykazuje DNA vyšší instabilitu než u kontrolních zdravých jedinců. U těchto pacientů míra fragmentace DNA v buňkách kostní dřeně korelovala s hodnotami periferní cytopenie. V případě RA s věnečkovitými sideroblasty (RARS) byla hladina zlomů DNA vyšší než u RA, ale na rozdíl od RA, u pacientů s RARS toto poškození buněk kostní dřeně s mírou periferní cytopenie nekorelovalo. Důležitým poznatkem bylo, že u obou skupin pacientů autorka našla také poměrně vysoké hladiny oxidačního poškození DNA. Zdrojem tohoto oxidačního poškození mohlo být u některých pacientů přidružené zánětlivé onemocnění, nebo zvýšená hladina sérového feritinu. Avšak míra oxidačního poškození

DNA neměla vztah ani k jednomu z těchto faktorů, ani k cytopénii. Přesto je pravděpodobné, že oxidační poškození DNA může být jedním z faktorů přispívajících k instabilitě genomu a k progresi onemocnění.

Dále se autorka zúčastnila komplexní studie vlivu pražského znečištěného ovzduší na zdravotní stav řidičů autobusů a zaměstnanců garáží. Autorka našla u obou sledovaných skupin zvýšené jak množství zlomů DNA, tak i hladinu oxidovaných bází DNA. Množství oxidovaných bází korelovalo s expozicí benzénu. Zjištěná oxidace DNA byla v relaci k zjištěné oxidaci proteinů a lipidů u řidičů což ukazuje na oxidační stres navozený u těchto pracovníků expozicí karcinogenním polycyklickým aromatickým uhlovodíkům (k-PAU), které byly identifikovány ve vdechovaném znečištěném vzduchu.

Zajímavé výsledky přinesla analýza polymorfizmů některých genů zúčastněných v reparaci DNA. Tak bylo zjištěno, že přítomnost alespoň jedné alely hOGG1 (Cys) vedla ke zvýšení hladiny oxidačního poškození DNA. Jiná situace byla u indukce zlomů DNA, kde se u jedinců homozygotních v alele XPD23 (Gln/Gln) projevila vyšší citlivost k indukci zlomů DNA v porovnání s nositeli standardní alely.

Náplní dalšího článku bylo studium účinků různých superparamagnetických nanočástic oxidů železa v podmínkách in vitro na lidské kmenové buňky izolované z kostní dřeně. Tyto buňky, získané od dvou dárců, byly inkubovány v přítomnosti testovaných nanočástic s různou povrchovou úpravou po dobu 72 hodin a následně dalších 72 hodin v čistém médiu. Současně s poškozením DNA byla u těchto buněk sledována viabilita, oxidace lipidů a proteinů a další parametry. Všechny typy nanočástic indukovaly v buňkách poškození DNA. Kromě přímých zlomů DNA se jednalo také o oxidační poškození, jak bylo zjištěno modifikovaným kometovým testem s využitím enzymů štěpících DNA v místě přítomných oxidovaných DNA bází. Podstatné bylo, že poškození DNA bylo detekováno i u buněk, u kterých nebyla zjištěna snížená viabilita, což svědčí pro přímý genotoxický účinek, který se může projevit i při absenci akutních toxických účinků. Tyto výsledky mají proto význam pro hodnocení rizik využití testovaných a podobných nanočástic v medicínské praxi.

Předložená disertační práce je založena na moderních molekulárně genetických experimentálních přístupech. Ke splnění vytýčených cílů práce autorka zvládla náročné molekulárně genetické metody jako je jednobuněčná gelová elektroforéza a další. Práce obsahuje přínosné nové poznatky, které mají význam pro obor genotoxikologie.

Autorka zvládla velice náročné experimentální postupy, prokázala schopnost kritického hodnocení získaných výsledků a schopnost uvést tyto výsledky do kontextu s nejnovějšími poznatky o etiologii myelodysplastického syndromu, o působení látek znečišťujících ovzduší a mechanismech působení nanočástic. Prokázala tak schopnost samostatně řešit náročné vědecké problémy. Výsledky práce jsou publikovány v časopisech s náročným recenzním řízením, takže na práci lze jen těžko hledat nějaké nedostatky. Po věcné stránce nemám k práci připomínky. Vědecká úroveň práce je vysoká a splňuje nároky předepsané pro udělení hodnosti PhD.