

Oponentský posudek na disertační práci Oksany Sevastyanové, M.D. „Genotoxicity of organic air pollutants studied by DNA adduct detection“

MUDr Sevastyanová, zaměstnaná v Laboratoři genetické toxikologie Ústavu experimentální medicíny (ÚEM) AV ČR, v.v.i, podává v angličtině disertační práci z oblasti genetické toxikologie, jako podklad pro získání titulu Ph.D. v komisi studijního programu Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Podkladem disertace (uváděný jako Appendix 1-5) je pět publikací v anglické jazyce, uveřejněných (4 práce) či předložených k publikaci (1 práce) v roce 2007 v prestižním a v oboru genetické toxikologie asi nejuznávanějším mezinárodním časopise Mutation Research (Elsevier). V rozsáhlém autorském kolektivu těchto prací, ve třech případech složený i z pracovníků jiných institucí, je Dr. Sevastyanova dvakrát jako první autorka. Vlastní disertace pak na 50 stránkách shrnuje hlavní výsledky z těchto publikací na nichž se, jak předpokládám, autorka disertace převážně podílela.

Na všech pěti publikacích jsou jako spoluautoři (vedle dalších) uváděny vůdčí osobnosti Laboratoře genetické toxikologie ÚEM AV ČR, vedoucí laboratoře a „supervisor“ disertantky R.Šrám a dále J. Topinka a B. Binková, kteří zřejmě byli i jejími hlavními rádci v celkovém tematickém zaměření disertace i po její metodické a interpretační stránce. Velkou výhodou Dr. Sevastyanové byla právě skutečnost, že mohla využít dlouholetých zkušeností i uznávaného postavení Laboratoře genetické toxikologie ve studiu genetických účinků látek zevního prostředí a jejich směsí a to jak na úrovni laboratorních modelů tak v oblasti epidemiologických studií lidské populace, podložené širokou metodickou základnou na vysoké úrovni, špičkovým přístrojovým vybavením, dobrou organizací práce, zajištěnými servisními službami (zde např. pro analýzu extrahovaných kancerogenních polycyklických aromatických uhlovodíků, dále k-PAU), širokými vazbami na uznávané laboratoře v zahraničí a v neposlední řadě i na české poměry nadprůměrným finančním zabezpečením.

Díky tomu mohla navázat na předešlé práce výše uvedených pracovníků laboratoře a jejich spolupracovníků a spolupublikovat nové cenné poznatky o genotoxických účincích komplexních směsí znečištěného ovzduší, zejména organických látek (a z nich zejména k-PAU), extrahovatelných z městských respirabilních prachových částic o velikosti až nad 10 um (PM 2,5 a PM 10) zachycených na speciálních filtrech a vzorkovačích buď během zimního a letního období na různých lokalitách nebo v případě epidemiologických studií pomocí osobních odběrových zařízení. Analýza účinků komplexních směsí i případně jejich jednotlivých složek, vyjádřená převážně tvorbou a množstvím DNA aduktů zjištěných pomocí

metody 32P poslabelingu, je v disertaci rozdělena do dvou větších celků : a) in vitro studie, zahrnující acelulární test na brzlíkové DNA, a na třech lidských buněčných kulturách, přičemž na jedné z nich bylo provedeno srovnání citlivosti třech biomarkerů (DNA adukty, DNA zlomy a exprese proteinu p53), b) molekulárně epidemiologické studie na skupině městských strážníků v centru Prahy, vystavených v určitém zimním a letním období účinkům k-PAU absorbovaných na respirabilních částicích vzduchu.

V úvodní části vlastního textu disertace prokázala disertantka velmi dobrou orientaci v problematice, kterou experimentálně řešila. Pozoruhodná pro mě byla skutečnost, že převážná část citovaných prací je plus minus z 21. století. Znamená to, že toto období přineslo rozhodující kvalitativní „zlom“ v poznání genotoxických účinků komplexních směsí, PAU apod. ?

V tomto literárním úvodu jsem trochu postrádal podrobnější shrnutí o podstatě vzniku (na molekulární úrovni) aduktů, o jejich typech po působení PAU, o genech resp. proteinech, které tyto lze reparují atp.

Podobně jsem postrádal i podrobnější vysvětlení podstaty metodiky i technické detaily zjištění aduktů (32P poslabelingu), uvážíme-li, že disertace je založena převážně na této metodice.

Zaujala mne část popisující výsledky pokusů, sledujících interakce umělých směsí PAU (str. 11-13). Nabyl jsem dojmu, že zatím nejsou známy obecnější příčiny, proč jednou dojde k aditivnímu, jednou k synergickému a jednou k antagonistickému efektu. Lze v blízké době očekávat nějaký zásadnější průlom, resp. nový přístup v řešení příčin těchto často rozporuplných výsledků?

Všechny výsledky uváděné v disertaci, velmi srozumitelně a věcně shrnuté i v autoreferátu, považuji za velmi cenné pro další rozvoj práce řešených problematik, ať již jde o možnost nebuněčných testů in vitro na thymové DNA (+ S9 frakce v případě PAU), o HePG2 buňky jako nejvhodnější pro zjišťování genotoxického potenciálu směsí, o více méně stejném kvalitativním složení směsí z tak různých lokalit, jako je Praha, Košice či Sofie, o rozhodující roli koncentrací k-PAU a zejména B(a)P pro genotoxické účinky bez ohledu na koncentraci respirabilních prachových částic i o výsledky epidemiologických studií na pražských policistech. Ostatně, jejich věrohodnost a originalita byla prověřena lépe než mnou (nespecialistou) obvykle velmi přísnými recenzenty (specialisty) publikací pro Mutation Research.

V práci o vlivu genetického polymorfismu na individuální citlivost policistů vůči komplexním směsím mne překvapilo, že žádný vliv neměly geny pro reparaci DNA (na rozdíl od genů pro metabolickou aktivaci, resp. detoxifikaci PAU). Lze to nějak vysvětlit ?

Převážná část výsledků i z nich vyvozených závěrů v disertaci se shoduje s výsledky a závěry oněch pěti publikací v Mutation Research, které tvoří

podklad disertace a které jsou dílem poměrně velkých kolektivů. Považoval bych proto za velmi žádoucí, aby disertantka vymezila svůj konkrétní podíl na práci těchto kolektivů.

Závěrem mohu konstatovat, že disertační práce MUDr O. Sevastyanové má velmi vysokou úroveň jak po stránce kvality výsledků tak jejich interpretace a stránce formální a po zodpovězení připomínek, zejména po uspokojivém vysvětlení svého podílu na výsledcích doporučuji, aby komise pro obhajobu její disertace vyslovila souhlas s udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 9.8.2007

RNDr. Jiří Velemínský, DrSc