

Posudek na Magisterskou práci Ivany Tomšíkové

DNA repair polymorphism in general population and relationship to DNA damage.

Předložená práce v rozsahu 62 stran je zaměřena na analýzu poškození DNA u vybrané populace pomocí kometového testu a vztahu tohoto poškození k polymorfismu vybraných genů zúčastněných v reparaci DNA.

Autorka zvládla velice náročně moderní metody genové analýzy pomocí techniky PCR pro řadu analyzovaných genů a rovněž techniku kometového testu pro detekci zlomů (alkalilabilních míst) DNA. Počet analyzovaných jedinců (100 pro genotypizaci a 50 pro kometový test) je úctyhodný a rozsahem bohatě dostačující pro magisterskou práci.

Sám úkol provést analýzu poškození DNA u vzorků lymfocytů izolovaných ze zmražené krve byl velice obtížný. Tato oblast není stále metodicky propracovaná.

Anglicky napsaná práce je zpracovaná pečlivě a je vybavena přehlednými schémata, tabulkami a grafy. Teoretický úvod je zpracován v šíři přesahující samotnou náplň práce a svědčí o zodpovědném přístupu autorky ke zpracování tématu.

Autorka stanovila u analyzovaného souboru genotypovou distribuci a frekvenci alel u genů zúčastněných v reparaci DNA a to : XPD exon 23 (A-C), XPC exon 15 (A-C), XPG exon 15 (G-C), XRCC3 exon 7 (C-T), hOGG1, exon 7 (C-G). U padesáti jedinců potom byla stanovena frekvence zlomů DNA a Fpg míst (reprezentujících oxidativní poškození DNA).

Zjištěné poškození DNA vyjádřené jako průměrné množství alkalilabilních míst (zde reprezentované hodnotou T%) je poměrně vysoké. Tato hodnota by se u normální populace měla pohybovat do 20 %. Zde zjištěné vyšší poškození evidentně není způsobeno použitou metodou, ale tím, že byla použita zmražená krev. Procesem zmražení evidentně dochází k dalšímu poškození buněk a tím i ke zvýšení poškození DNA. Zvýšením poškození procesem zmražení se pravděpodobně zvýšila i variabilita výsledů. To samozřejmě negativně ovlivňuje možnost stanovení korelací poškození DNA s dalšími parametry jako je věk, ale i s příslušnými genotypy. Zajímavé je zjištění, že v těchto vzorcích lymfocytů ze zmražené krve se vyskytují buňky jak se silně poškozenou DNA, tak s menším poškozením.

Daleko vyšší validitu, než samotné zlomy DNA (zde general DNA damage) mají výsledky stanovení míst citlivých k Fpg. Tyto další zlomy způsobené akcí enzymu totiž odrážejí pouze skutečný počet 8-oxo-dG a jejich počet není nijak ovlivněn (jako v případě general DNA damage) procesem zmražení krve. Avšak ani zde nebyla zjištěna žádná korelace s některým z genotypů. Je však potřeba brát v úvahu, že celkový počet FPG nebyl u většiny analyzovaných jedinců nijak vysoký.

V diskusi autorka detailně diskutuje a kriticky hodnotí získané výsledky v kontextu s nejnovějšími publikovanými poznatky.

Práci považuji za velmi cenný příspěvek k metodickému řešení analýzy poškození DNA u lidí. Ta naráží na problém, který se pokusila řešit tato práce: totiž, že laboratoř provádějící složité analýzy se většinou nenachází v blízkosti analyzované skupiny lidí a často nemůžeme odebrat vzorky velké skupině lidí najednou, ale musíme je sbírat postupně. V takovýchto případech by bylo výhodné mít možnost odebrané vzorky skladovat (zmražené), a transportovat je do plně vybavené laboratoře. Bohužel analýza poškození DNA u zmražených buněk selhává, a to přes to, že byly zkoušeny různé techniky šetrného zmražení krve, nebo izolovaných lymfocytů.

K práci mám několik připomínek:

Metody

Autorka by se měla vyvarovat

-neurčitých a nepřesných výrazů jako: Str. 31 , 6 řádek shora ..suspension was gently defrosted...“ autorka by měla uvést, při jaké teplotě a jak byly buněčné rozmražovány .

-a laboratorních slangových výrazů, jako na př str 32, 5. řádek zdola – „ ...during the comet experiment...“

Diskuse

Str. 45 3 řádek zdola, do diskuse nepatří komentování metodických potíží plynoucích z vlastních chyb, jako je příliš hustá suspense buněk v agaróze.

Byl bych opatrný zmiňovat se v závěru práce o tom, že kometový test dosud není plně akceptován pro odhad individuálního rizika. Jde totiž o to, že mnoho studií je prováděno způsobem, který nevede v jasným výsledkům (z metodických „důvodů je to obtížné, podobně jako analýzy zmražených vzorků krve v této práci). Kometový test dává v experimentech poměrně přesné výsledky. Jeho využití pro biomonitoring je však komplikováno jeho poměrně velkou citlivostí, se kterou ukáže veliké variace i u kontrolních skupin jedinců. Podmínky kometového testu jsou snadno kontrolovatelné. Co není dobře kontrolovatelné (jak uvádí autorka v diskuzi na straně 51, 8 řádek zdola), jak se autorka sama přesvědčila, je samotný analyzovaný materiál, jeho odběr, transport, skladování. Nejméně kontrolovatelný je biologický materiál (lidé, jejich životní styl). Kometový test je tak citlivý, že zachytí všechny tyto vlivy. Variabilní není metoda, ale materiál. Tento komentář v diskuzi nepovažuji za chybu autorky, ale za důsledek chybného chápání výsledků analýz kometovým testem řadou autorů, mnohdy věhlasných.

Předložená práce jasně dokumentuje teoretické i metodické schopnosti autorky samostatně řešit náročné vědecké problémy a úkoly. Svou metodickou náročností práce spíše převyšuje obvyklé magisterské práce v tomto oboru. Z těchto a řady dalších výše zmíněných důvodů proto doporučuji práci k obhajobě.

Dne 25.5.2006



Doc.RNDr. Rudolf Štětina, CSc.