

Oponent: RNDr. Jiří Marhan, CSc.

Posudek oponenta

Diplomová práce Bc. Markéty Sekerkové „Micronucleus test, srovnání *in vivo* a *in vitro* metody“ je významnou součástí zavedení nové metodiky do praxe. Zadání diplomové práce je aktuální a je dobrým příkladem propojení akademického potenciálu s podnikovou sférou.

Práce má standardní členění na rešerši, část teoretickou, experimentální, zhodnocení výsledků a závěr. Anotace je celkem v pořádku, u anglické verze ale lze pouze ocenit pouze samostatnost překladu autorkou. Od druhé věty je někde slovosled tak nešťastný, až věty nedávají správný smysl.

Jinak je práce psaná „čtivě“ a pravopisně v pořádku (snad až na dvě drobnosti a tři nepodstatné přepisy odborných termínů). Poznatky z literatury a teoretická část jsou relativně dobrou rešerší základních informací a jsou přehledně zpracovány. V obecné rovině prokazuje schopnost diplomantky orientovat se v úzké a specializované problematice genotoxických testů. Metodická i výsledková část jsou dobře uspořádány a obsahují potřebné informace. Diskuze se obecně dotýká základních bodů problematiky testu včetně navazujícího srovnání s dostupnými daty.

Po formální stránce mám k práci několik poznámek

Rešerši

MNT test *in vivo* je o něco starší než uvádí autorka. Platnou metodikou OECD Guidelines je již od r. 1983 a ne až od r. 1997. Obdobně BioTest nebyl prvním pracovištěm u nás, ale jeho mateřská společnost VÚFB a dále pak VÚOS tuto metodiku praktikovali již v r. 1987. Také by bylo vhodné zmínit, že test je možno provádět nejen na potkanech.

V rámci definování genotoxicity bych jasně uvedl působení širší než jen na DNA. Patří sem obecně i poškození chromozomů a to může být např. přes mitotický aparát nebo strukturální bílkoviny chromozomu. A právě MNT je schopen některé z těchto účinků zachytit.

Snad jen pár poznámek k jiným testům. U Amesova testu by bylo vhodné zmínit i tryptofan auxotrofní kmeny *Escherichia coli*. U testu chromozomálních aberací není vhodně popsáno použití kolchicinu a vytváří tak dojem, že autorka principu testu zcela nerozumí.

Chemické názvosloví

- je nutné zvolit jednotný styl, v případě studentské práce je to obvykle „progresivní“ forma, tedy např. metyl a glukóza místo methyl a glukosa
- 3.3.1. správně je „skupina karbonylových derivátů uhlovodíků“

S9 frakce

její zařazení není přehledně vysvětleno. V této souvislosti je vhodné uvést dělení na mutageny přímé a dále nepřímé, kdy tento účinek má některý z metabolitů původní substance. Enzymatická S9 frakce je nejpoužívanější aktivační směs, která v mnoha *in vitro* testech zvyšuje záchyt nepřímých genotoxických látek.

Metodická část

- opět je nutno zvolit jednotný styl, není vhodné střídat ve větách „vyjmete“ a „přidá se“ (použito dokonce i v jednom souvětí)
- PBS, tento důležitý pufr zde není dobře uveden, ani ve zkratkách, ani jeho složení. Naopak podružný pufr Sørensenův (součást barviva preparátů) je zde uveden podrobně. PBS je zde negativní kontrolou a tato důležitá složka takovýchto testů musí být definována zcela jednoznačně. Navíc (zjevně nešťastným přepisem) je v části 5.2.2 uveden jako kontrola pozitivní.
- předtest 4.2.10.3, rozsah dávek v předtestu je (především u neznámých látek) větší než uvedených 1-2 řády, jde minimálně o 2 či spíše 3 řády
- v bodě 5 je vhodné použít termín „falešně negativní“ místo zavádějícího „negativně pozitivní“
- v další větě „V případě pozitivních výsledků je důležité prokázat, že testovaná látka nebyla genotoxická pouze při vysokých koncentracích“ mi není jasná uvedená důležitost. U prokázané genotoxicity není klíčovým faktorem dávka, protože tento účinek je kumulativní.

Jako dotaz pro obhajobu bych uvítal obecnou informaci o procesu validace nové metodiky toxikologického testu před zařazením do OECD Guidelines, popř. zmínku o institucích, které se specializují na vývoj *in vitro* metodik.

Cíl diplomové práce byl naplněn vhodným srovnáním metodik mikrojaderného testu. Práce sama o sobě nemá publikační hodnotu. Je pochopitelně ovlivněna časovými a finančními limity vlastního experimentálního rozsahu ve společnosti BioTest, které neumožnily vyváženější zařazení testovaných látek. Je i částečně poznamenána jednou nezdařenou kultivací. To je ovšem při zavádění nových metodik obvyklé a mnohdy naopak poskytuje další informace pro standardizaci experimentálního provedení. Práce je ucelenou částí interního procesu firmy, která zavádí novou progresivní metodiku do praxe. Je platnou součástí interní validace metodiky pro potřeby firmy, kdy jde o její aplikaci v systému Správné laboratorní praxe, tedy v rámci mezinárodně uznávaného standardu certifikace preklinických testů léčiv a bezpečnostních testů chemických látek.

Souhrnně konstatuji, že práce splňuje všechny podmínky pro její postoupení k obhajobě a hodnotím ji klasifikačním stupněm "**v ý b o r n ě**".

Dne 20.5. 2010


podpis oponenta