

Studium metabolismu 3-aminobenzanthronu a indukce biotransformačních enzymů

Autor: RNDr. Jana Mizerovská

Oponent: Doc. RNDr. Jaroslav Mareš, CSc., Ústav biologie a lékařské genetiky II. LF UK, Praha

Předložená česky psaná doktorská disertační práce RNDr. Jany Mizerovské má formu komentovaného souboru šesti původních vědeckých publikací, opatřených společným úvodem, metodami, výsledky, diskusí a souhrnem a použitou literaturou, celkem na 111 stranách, a připojeného souboru publikovaných nebo k publikaci přijatých vědeckých článků na dalších 83 stranách. U čtyř prací je RNDr. Jana Mizerovská prvním autorem, u jedné třetím a u poslední čtvrtým autorem. Všechny uvedené články jsou původní vědecké články publikované v mezinárodních časopisech s vysokým impaktfaktorem. Práce byly publikovány v letech 2007 až 2010. Soubor prací vytváří celek logicky propojený bohatým metodickým přístupem založeným na enzymové, organické substrátové a kinetické analýze.

Cílem disertační práce bylo

- a) určit, které cytochromy P450 se účastní metabolismu a oxidace 3-aminobenzantronu (3-ABA)
- b) zjistit, zda se oxidace 3-ABA účastní peroxidasy
- c) zjistit zda 3-nitrobenzantron (3-NBA) a 3-ABA indukují biotransformační enzymy, zvláště NQO1 a P450 1A1/2 a
- d) detekovat indukci enzymů NQO1 a P450 1A1/2 pomocí 3-NBA a 3-ABA v tkáních potkana po jejich intraperitoneální premedikaci a intratracheální instilaci 3-NBA.

V poměrně rozsáhlém úvodu v autorka shrnuje nejmodernější poznatky o mikrosomálním monooxygenasovém systému, cytochromech P450, peroxidasách, biotransformačním enzymu NQO1 a metabolismu aromatických uhlovodíků. Tato část spisu svědčí o rozsáhlých teoretických znalostech autorky a o jejím didaktickém nadání, neboť další pochopení tak komplikovaných dějů vysvětlení nezbytně vyžaduje.

V průběhu řešení RNDr. Mizerovská používala širokou paletu moderních biochemických a elektromigračních metod, které podrobně popsala. Zvláště analýzy organických produktů oxidačně-redukčních enzymových reakcí vyžadovaly přesnost a byly časově náročné. Ve

všech případech byla volba metody adekvátní testovaným hypotézám. Autorka osvědčila mimořádnou schopnost prakticky zvládnout tyto náročné metodiky.

Předložená disertační práce přináší unikátní výsledky studia metabolismu a regulačního potenciálu karcinogenní sloučeniny 3-nitrobenzanthronu a jejího derivátu 3-aminobenzanthronu. Kromě toho uvádí i důležité poznatky o enzymových aktivitách cytochromů P450 a dalších enzymových systémech, které se účastní metabolismu uvedených látek.

Posuzují-li množství získaných dat a použité metody, musím ocenit trpělivost a pracovní nasazení autorky, která je po dobu svého postgraduálního studia získávala, hodnotila a interpretovala. Mezi nejdůležitější mezi nimi patří detekce tří metabolitů 3-ABA: N-hydroxy-3-aminobenzanthronu, 3-NBA a M18 s dosud neznámou strukturou. Dále zmiňuji určení premedikačních stimulans, fenobarbitalu, pregnenolon-16 α -karbonitrilu a β -naftoflavonu, průkaz účasti CYP1A, 2B, 3A na oxidaci 3-ABA, data o oxidaci 3-ABA peroxidasami, z nichž nejúčinnější je křenová peroxidasa, data o indukci genové exprese CYP1A1 a NQO1 po expozici 3-ABA a 3-NBA a s tím související tvorbě aduktů molekul 3-ABA, 3-NBA a DNA.

Po stránce formální je práce zpracována na velmi dobré úrovni, je přehledně a logicky členěna. K dobré orientaci v odborně náročném textu velmi pomáhá seznam použitých zkratk. Práce je napsána téměř bez překlepů a důsledně klasickým pravopisem odborných názvů, přesto bych se při psaní s a z přimlouval za moderní pravopis u slov elektroforesa a katalysovat. Oceňuji minimální použití anglismů. Drobné chyby jsem objevil v obrázcích č. 5 a 12, kde doporučuji český text a v tabulce č. 8, kde není jasné na první pohled, jedná-li se o tkáň ledvinnou nebo plicní.

Ve vlastní tématice nemá práce zásadní slabiny, které by bylo třeba vytknout. Svědčí to o velmi dobrém vedení školitelem a o odborných kvalitách řešitelského teamu. Ostatně všechny výsledky prošly velmi přísnou recenzí v redakcích prestižních mezinárodních časopisů. Domnívám se, že autorka fundovaně a elegantně vysvětlila v kapitole Výsledky a diskuze rozdíly ve výsledcích mezi různými tkáněmi, pokud jde o enzymové aktivity, genovou expresi enzymů a tvorbu aduktů. Proto budou mít poznámky, připomínky a otázky oponenta pouze doplňující význam.

Poznámky a připomínky oponenta:

- na str. 24 doporučuji použít pojmu genová rodina

- české názvosloví enzymů je jednoslovné, drobné chyby na str. 29-32 vznikly pravděpodobně mechanickým překladem anglického textu

Otázky oponenta:

- v úvodu se autorka uvádí jako molekulární příčinu vzniku nádorových onemocnění pouze mutaci jaderné DNA, jaký význam přisuzuje epigenetickým příčinám vzniku a rozvoje nádorových onemocnění?
- jak nulová alela genu NQO1 zvyšuje rizika vzniku a progresu uroteliálních nádorových onemocnění?
- experimenty popisované v disertaci byly prováděny *in vitro*, kde podmínky mohou být značně odlišné od podmínek *in vivo*, existují nějaké podobné paralelní studie prováděné *in situ* ve tkáních ledvin, plic a jater, založených na analýze histopatologické?
- může být imunochemická detekce proteinů při westernově přenosu nahrazena chemiluminiscenční metodou, pokud ano, proč ji autorka nevyužívala?
- jak si vysvětluje autorka represi cytosolární NQO1 v tkáni ledvin po intraperitoneální aplikaci 3-ABA?

Závěr:

Autorčin pohled na moderní přístupy biochemického a molekulárního studia karcinogenních sloučenin, je komplexní a fundovaný, je doložen kvalitními výsledky vlastního experimentálního výzkumu a má prokazatelně jasný biomedicínský význam. Celkově lze disertační práci hodnotit pozitivně jako velmi užitečný příspěvek, poskytující souborný pohled na problematiku metabolismu 3-ABA. Z práce jsou zřejmé hluboké znalosti a zkušenosti autorky s danou tematikou, ale i mimořádná metodická a instrumentální erudice v náročné a specializované oblasti biochemie, organické analýzy a molekulární biologie.

Konstatuji, že předložená disertační práce splňuje všechny požadavky kladené na disertační práci doktorského studia biochemie. RNDr. Jana Mizerovská prokázala mírou vrchovatou schopnost samostatné vědecké práce, a proto doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro disertační řízení a jmenování RNDr. Jany Mizerovské PhD.

V Praze 20. srpna 2010.

Doc.RNDr. Jaroslav Mareš, CSc.

jaroslav.mares@lfmotol.cuni.cz