

Oponentský posudek doktorské disertační práce RNDr. Jany Mizerovské

Studium metabolismu 3-aminobenzanthronu a indukce biotransformačních enzymů

Předkládaná disertační práce RNDr. Jany Mizerovské je zaměřena na studium oxidace metabolitu karcinogenní sloučeniny 3-nitrobenzanthronu, 3-aminobenzanthronu cytochromy P450. Práce je dělena na velmi přehledný úvod zabývající se, jak obecnými procesy kancerogeneze a biotransformace xenobiotik v organismu, tak specifickými vlastnostmi cytochromů P450 a peroxidas participujících na metabolické aktivaci 3-aminobenzanthronu. Následující část úvodu je pak věnována biotransformaci 3-nitrobenzanthronu, a to především NAD(P)H:chinonoxidoreduktasou 1 a dále je věnována vlastním aromatickým aminům a aromatickým nitrosloučeninám.

Po jasně formulovaných cílech následuje kapitola *Materiál a Metody*, kde jsou často návody zpracovány formou přehledných tabulek umožňující naprosto stejnou interpretaci postupu, neboť např. vedle výsledných koncentrací jsou uvedena i množství a koncentrace zásobních roztoků. Další část *Výsledky a diskuse* přináší unikátní výsledky z oblasti studia 3-nitrobenzanthronu a jeho potenciálu indukovat biotransformační enzymy podílející se jak na jeho vlastní přeměně, tak na přeměně jeho metabolitu, 3-aminobenzanthronu. Výsledky jsou členěny do 4 kapitol. Bylo zjištěno, kterými mikrosomálními systémy (včetně rekombinantních) a peroxidasami je 3-aminobenzanthron oxidován; v kterých orgánech 3-aminobenzanthron a 3-nitrobenzanthron indukuje expresi biotransformačních enzymů a zda v těchto orgánech metabolická aktivace 3-aminobenzanthronu a 3-nitrobenzanthronu souvisí s tvorbou aduktů s DNA. Vysokou úroveň výsledků uvedených v této části dokumentuje 5 publikací uveřejněných v letech 2007-2009 v časopisech s recenzním řízením, z nichž 4 jsou impaktované. Další publikace je pro uveřejnění v odborném časopise připravena. Tyto publikace jsou součástí přílohy.

Práce je zakončena koncisním závěrem, shrnujícím nejdůležitější poznatky disertační práce. Nechybí seznam použité literatury obsahující 194 literárních a internetových zdrojů. Celkový rozsah práce je 187 stran, z toho 111 stran vlastního textu.

Z předkládaného zpracování disertace vyplývá velké množství experimentální práce, neboť nebyl použit jediný induktor cytochromů P450, ale 5 (indukce β -naftoflavonem, fenobarbitalem, pregnenolonem-16 α -karbonitrem a ethanolem), nebyl použit jeden způsob aplikace 3-nitrobenzanthronu, ale jak intratracheální tak intraperitoneální způsob. Navíc byly mikrosomy izolovány z více tkání (plic, jater, ledvin, plic), dokonce byly použity i mikrosomy rekombinantní. Také bylo sledováno více enzymů metabolizujících xenobiotika. Jednak je

také ze zpracování patrná velká preciznost, a to jak v interpretaci výsledků, tak ve zpracování rešerše a literárních zdrojů.

Přesto bych k práci měla několik drobných připomínek a několik dotazů:

1. Kapitulu 3.3. Premedikace laboratorních potkanů bych doporučila doplnit o počty premedikovaných zvířat v jednotlivých skupinách a jakého byly kmene. Neovlivnilo použití dvou kmenů potkanů Wistar a Sprague-Dawley a použití buď samců, nebo samic výsledky?
2. Jak jsou připravené cytochromy P450 skladovány a jak jsou stabilní?
3. V obrázcích 15 a 16 je na ose y použita relativní plocha píku, jednotlivé metabolity oxidace 3-aminobenzanthronu byly detekovány HPLC. Nebylo by možné provést kalibraci a získat tak koncentraci, nebo látkové množství metabolitů?
4. V obrázku 17 není na ose y uvedena jednotka odpovídající reciproké hodnotě rychlosti reakce. Proč je v tabulce 7 jednotkou V_{\max} pouze min^{-1} ?
5. V tabulce 5 jsou uvedeny kinetické parametry oxidace 3-aminobenzanthronu jaterními mikrosomálními systémy. Očekávala bych, že maximální rychlost reakce bude v případě mikrosomů premedikovaných potkanů vyšší než v případě mikrosomů kontrolní skupiny. Můžete vysvětlit proč tomu tak není, je to z důvodu, že u kontrolních mikrosomů se může na oxidaci 3-aminobenzanthronu podílet více než jeden cytochrom P450?
6. Jak byly proloženy body v obrázcích 19 a 20? V případě 19a a 19c uvedená hyperbola neprochází nulou, jak by odpovídalo rovnici Michaelise-Mentenové. Nebylo by vhodnější sigmoidální proložení, které by ukazovalo na vyšší počet vazných míst v molekule enzymu pro daný substrát?
7. Hodnoty na osách y na obr. 19, 20 a 22 by měly odpovídat rychlosti reakce, uvedené množství přeměněného 3-aminobenzanthronu by tedy mělo být vztaženo na jednotku času.

Další drobnosti v textu:

- V seznamu zkratk je NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1 zkracována jednak jako DT-diaforasa a jednak jako NQO1.
- Rovněž v seznamu zkratk maximální rychlost reakce malým písmenem v_{\max}

- U obr. 29, 30, 32 a 33 bych doporučovala v legendě vysvětlit zkratky použité na ose x.

Závěrem lze říci, že odborná úroveň předkládané disertační práce RNDr. Jany Mizerovské je vysoká, získané výsledky jsou unikátní a studovaná problematika vysoce aktuální. Předloženou disertační práci mohu jednoznačně doporučit k obhajobě. Práci lze hodnotit velmi kladně a autorku doporučit k získání vědecké hodnosti Ph.D.

RNDr. Veronika Doubnerová, Ph.D.
Katedra biochemie Př.F UK v Praze

Praha 31. 8. 2010