

Ing. Miroslav Kuchař, DrSc.,
Zentiva, a.s.
U kabelovny 130,
102 37 Praha 10

Oponentní posudek
na disertační práci (PhD.) Mgr. Michala Jágra na téma:

Studium aduktů styren-7,8-oxidu s cysteinem, histidinem a lysinem v lidském globinu

Předmětem předložené disertační práce je studium aduktů aminokyselin se styren-7,8-oxidem (SO), který je hlavním primárním metabolitem průmyslově významné substance styrenu. Základním cílem práce bylo vyvinout metodický postup, který by umožňoval kvantitativní analýzu těchto aduktů v lidském globinu. Výsledky disertační práce autor publikoval v 9 sděleních, z nichž 5 vyšlo ve formě publikací, zbývající 4 mají charakter přednášek. Disertace je sepsána formou samostatné publikace a tedy nikoliv komentovaným souborem vybraných publikací. Je rozvržena do tří částí konsistentně na sebe navazujících a celkově rovnoměrného rozsahu, z nichž více než polovina představuje nejdůležitější část, tj. popis výsledků a jejich diskusi. Součástí je rovněž seznam zkratk (což je správné), které však autor poněkud nadužívá na úkor srozumitelnosti textu. Pokud se název vyskytuje v textu dvakrát, či třikrát, je zkratka zbytečná.

Autor osvědčil v průběhu experimentální práce rozsáhlé dovednosti v analytické chemii, organické syntéze i v experimentální biochemii. Příprava, izolace a charakterizace 16 optických isomérů aduktů SO se třemi aminokyselinami sama o sobě představuje značný objem velmi pečlivě provedené experimentální práce. Na ni pak navazuje rozsáhlá analytická studie včetně analytického hodnocení zmíněných aduktů v biologickém materiálu. Experimentální části věnoval autor velkou pozornost; syntetizované regioisoméry jsou jednoznačně identifikovány $^1\text{H-NMR}$ a hmotnostními spektry a rovněž rozdělení diastereoisomérů bylo provedeno s dobrým rozlišením.

K předložené práci mám několik připomínek a dotazů:

Str. 30: zde je zmíněn vztah mezi $\log(M_r)$ a pohyblivostí, který je na str. 100 využit k výpočtu M_r . Tento vztah má charakter lineárního vztahu Gibbovy energie (LFER). Je znám vztah pohyblivosti vyjádřené vzdáleností s ke změně Gibbosvy energie spojené s tímto pohybem?
Str. 55: Rozdíl v posunu signálu H_α v regioisoméru **2** vůči **1** se domnívám, že má rovněž hodnotu 0.95 (4.66 – 3.71).

Str. 68: Proč považujete za zajímavý stejný poměr isomérů histidinových aduktů při reakci s deuterovaným a nedeuterovaným SO? Domníváte se, že by se tímto zásahem měla změnit reaktivita histidinových N-atomů?

Str. 69: Byl při alternativní alkylaci 2-Br-1-fenylethanolem zkoušen též terciární amin?

Str. 80: Celková koncentrace všech aduktů SO v analyzovaném globinu je zde odhadována na dvojnásobek součtu hladin aduktů **1**, **3** a **8**. Měly by být v této souvislosti uvedeny důvody tohoto odhadu.

Str. 82: Při koncentrování aduktů SO s Cys, His a Lys na SPE kolonkách se využívá jejich rozdílné pohyblivosti ve srovnání s ostatními aminokyselinami. Jak je to v reálných vzorcích s SO adukty dalších aminokyselin (Val, Asp, Glu)?

Str. 90: Proč byly hodnoceny vzorky o koncentraci 1.0 a 2.0 mg/ml, když u reálných vzorků hydrolyzátu globinu dosahuje celková koncentrace 4.0 – 5.0 mg/ml? Pokud byl postupnou změnou koncentrace sledován nějaký cíl (podobně jako s rozdílným objemem vzorku), měl by být vysvětlen a zodpovězen.

Str. 95: Čím si vysvětlujete vcelku konsistentní výtěžky aduktu His 8 při zvyšujícím se objemu promytí v reálném vzorku globinu (viz tabulka 13) ve srovnání s výraznými rozdíly v modelových pokusech (viz tabulka 12).

Str. 100: Kalibrační přímková závislost by měla být doplněna jednak vlastním matematickým tvarem (směrnice, intercept) a dalšími statistickými kritérii (kromě r^2).

Str. 101: Vzhledem k důležitosti porovnání výsledků různých metod stanovení by měla být věnována větší pozornost výpočtu oněch 295 μmol aduktů na 1 g globinu. Je možno považovat hodnoty 180.2 μmol z tabulky 14, resp. 200 μmol z tabulky 9 ve výborném souladu s hodnotou vypočtenou na této straně (295 μmol)?

Z drobných formálních chyb upozorňuji na:

Str. 12: *detoxikace* místo detoxifikace

Str. 45: chloromravenčan

Str. 60: odkaz na tabulku 2 je chybný, správně: na tabulku 8

Str. 81: první odstavec by měl být jasněji formulován. Relativně menší množství SO se vztahuje pravděpodobně k poměru 100:1.

Přes tyto drobné připomínky závěrem mohu konstatovat, že autor ve své disertaci splnil všechny dílčí cíle, které na počátku deklaroval. Byla tak vyvinuta metoda, umožňující detekovat adukty SO v globinu na hladině až 1 nmol/g globinu a spekulativně – při využití citlivějších analytických metod – zvýšit citlivost této metody o další řád.

Předložená disertační práce Mgr. Michala Jágra představuje obsahově konsistentní vědeckou práci, která splňuje všechny náležitosti doktorské (PhD) disertační práce, a proto doporučuji, aby byla přijata k obhajobě jako podklad pro udělení vědecké hodnosti PhD.

V Praze 26. listopadu 2007

Miroslav Kuchař