

Oponentský posudek diplomové práce Lucie Svobodové

Oxidace protinádorového léčiva ellipticinu cytochromy 3A a 2B

Diplomová práce Lucie Svobodové řeší zajímavou a významnou problematiku metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu. Konkrétně se jedná o studium oxidace ellipticinu cytochromy P450 podrodin 3A a 2B. Dále je práce rozšířena o sledování vlivu cytochromu b_5 na oxidaci substrátu těmito cytochromy P450. Diplomová práce rozšiřuje poznání metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu cytochromy P450 3A a 2B podrodiny a doplňuje jej o poznatky vlivu cytochromu b_5 na tento metabolismus.

Úvodní část přináší informace o nádorových onemocněních a jejich terapii. Zvláštní kapitola je pak věnovaná zde studovanému protinádorovému léčivu, ellipticinu. Literární přehled dále obsahuje informace o biotransformaci xenobiotik a enzymech, které se těchto reakcí účastní. Autorka nám zde podrobně popisuje všechny složky mikrosomálního monooxygenasového systému včetně cytochromu b_5 .

Experimentální část práce informuje o použitých metodách. Je zřejmé, že se autorka seznámila s celou řadou biochemických a analytických metod, které při zpracování zadaného tématu použila. Zejména metody izolace cytochromu P450 2B4, NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b_5 , a dále příprava rekonstituovaného systému cytochromu P450 jsou časově velmi náročné a vyžadují značnou zručnost.

Výsledky diplomové práce Lucie Svobodové odpovídají jejímu zadání a přináší řadu nových poznatků. Autorce se podařilo izolovat cytochrom P450 2B4, NADPH:cytochrom P450 reduktasu a cytochrom b_5 . Při sledování oxidace ellipticinu cytochromy P450 bylo zjištěno, že cytochromy P450 3A podrodiny efektivně oxidují ellipticin narozdíl od cytochromů P450 podrodiny 2B, které v oxidaci ellipticinu nehrajou významnou roli. Dále bylo zjištěno, že nevýznamnější roli v metabolismu ellipticinu hraje lidský rekombinantní enzym cytochrom P450 3A4, který přeměňuje ellipticin na metabolity kovalentně modifikující DNA a to na metabolity 13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin. Také působení cytochromu b_5 na metabolismus ellipticinu bylo nejvýznamnější při oxidaci lidským rekombinantním cytochromem P450 3A4. To může mít zásadní význam při regulaci přeměny ellipticinu lidskými mikrosomy. Získané výsledky jsou cenné a mohou být využity pro další podrobné vědecké studium zejména v oblasti mechanismu působení protinádorových léčiv.

Po formální stránce je práce členěna obvyklým způsobem. Je přehledně a srozumitelně sepsána a doplněna řadou grafů a obrázků.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Pro SDS elektroforezu frakcí po chromatografii cytochromu b_5 na DEAE-Sepharose (obr. 15) byl použit 10% gel. Velikost cytochromu b_5 , jak se zmiňujete v úvodu, je 16 kDa a proto při SDS elektroforese na 10% gelu je protein detekován na samém čele elektroforesy, proto bych příště doporučila raději použít hustší gel.
2. Dále by mě zajímalo, zda po 20 minutách inkubace ellipticinu s rekonstituovaným systémem (kap. 3.3.4.1.2) byla oxidace ellipticinu zastavena, což je dle mého názoru

důležité, aby bylo množství metabolitů porovnatelné mezi jednotlivými inkubačními směsmi. Pokud byla reakce zastavena, tak jak?

3. Studium oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A6 bylo prováděno při pěti různých koncentracích tohoto enzymu. Proč oxidace cytochromem P450 2B4 byla prováděna jen při třech různých koncentracích enzymu?

Závěrem mohu konstatovat, že diplomová práce Lucie Svobodové splňuje požadavky kladené na práce obdobného typu. Proto ji plně doporučuji k obhajobě a k dalšímu řízení.

V Praze, 18.5.2007

Mgr. Kateřina Janouchová

