

Opravný lístek bakalářské práce PřF UK (Marie Rodová: Metabolismus vandetanibu cytochromy P450 exprimovanými v prokaryotním systému, Praha 2021)

1. Doplnění metodiky (str. 28) – určení kinetických parametrů

Z dřívějších studií je známo, že tvorba *N*-desmethylvandetanibu je v námi použitých koncentracích lineární po dobu 30 minut (Indra et al., 2019). Při měření kinetických parametrů bylo stanoveno množství vznikajícího metabolitu po 20minutové inkubaci pomocí HPLC a programu Chromeleon7. Získané plochy píků byly přepočteny tak, aby odpovídaly vznikajícímu množství metabolitu za minutu na nmol cytochromu. Na základě těchto hodnot byly následně sestrojeny grafy a určeny kinetické parametry pomocí softwaru Origin2016, metodou podle Levenberg-Marquardta neboli tlumenou metodou nejmenších čtverců.

Indra, R.; Pompach, P.; Martínek, V; Takácsová, P.; Vavrová, K.; Heger, Z.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Kopečková, K.; Arlt, V. M.; Stiborová, M. Identification of human enzymes oxidizing the anti-thyroid-cancer drug vandetanib and explanation of the high efficiency of cytochrome P450 3A4 in its oxidation. *International journal of molecular sciences*. 20.14: 3392 (2019).

2. Doplnění k tabulce 4.2 a 4.3 (str. 31 a 33)

V rámci vyhodnocení byla pro určení kinetických parametrů primárně zvolena Hillova rovnice. Na základě takto získaných Hillových koeficientů bylo následně aproximováno, že se v případě systémů CYP3A4BLR007 a CYP3A4BR040, kde hodnoty Hillových koeficientů jsou 1,10 a 1,07, nejedná o sigmoidální závislost a dále se s nimi pracovalo jako se systémy, které se řídí kinetikou dle Michaelis a Mentenové. Ve zbývajících systémech se již uvažovala určitá míra kooperace a kinetika dle Hillový rovnice. V tabulkách tak hodnota K_m odpovídá Michaelisově konstantě pro systémy CYP3A4BLR007 a CYP3A4BR040, tedy pro systémy, které se řídí kinetikou dle Michaelis a Mentenové. U zbylých systémů odpovídá hodnota K_m hodnotě koncentrace vandetanibu, při níž bude dosaženo poloviny maximální rychlosti a měla by tedy správně být označena jako $K_{0,5}$.

V tabulkách 4.2 a 4.3 také chybí jednotky. V případě V_{max} je jednotka plocha píku za minutu na nmol cytochromu P450 a v případě K_m resp. $K_{0,5}$ je to μM .

3. Oprava obrázku č. 4.1 (str. 32) a obrázku č 4.2 (str. 34)

Jednotka na ose y by měla správně být relativní plocha píku/min/nmol CYP

4. Upřesnění k diskuzi (str. 35 – 4. odstavec)

Enzymová kinetika systémů s cyt b₅ vykazuje hyperbolickou závislost na rozdíl od systémů bez cyt b₅, které vykazují závislost sigmoidální. To je v souladu s prací (Škriabová, 2020), kde byla sledována enzymová kinetika lidským rekombinantním CYP 3A5 exprimovaným v SupersomechTM. Zároveň to je v rozporu s výsledky studie (Indra et al., 2019), kde i systémy s cyt b₅ vykazovaly sigmoidální závislost. Sigmoidální závislost naznačuje možnost vazby dvou molekul vandetanibu do aktivního místa enzymu u systémů bez cyt b₅. Hodnoty Hillova koeficientu pro systémy CYP3A4BLR007 a CYP3A4BR040 (n = 1,10 a n = 1,07) naznačují velmi nízkou nebo žádnou kooperaci a vazbu pouze jedné molekuly vandetanibu do aktivního místa enzymu. A proto má význam zde využít kinetiku dle Michaelis a Mentenové. Enzymová kinetika systémů s nižší hladinou aktivity NADPH:CYP reductasy CYP3A4BLR007 (17 pmol/min) a CYP3A4LR006 (22 pmol/min) vykazuje nižší aktivitu oxidace než kinetika systémů s vyšší hladinou aktivity NADPH:CYP reductasy CYP3A4BR040 (130 pmol/min), CYP3A4R044 (142 pmol/min) a CYP3A4046 (112 pmol/min). Na základě hodnot K_m resp. K_{0,5} mají nižší afinitu k vandetanibu systémy s cyt b₅ oproti systémům bez přítomnosti cyt b₅.