



## KATEDRA BIOCHEMIE

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Hlavova 2030  
CZ-128 40 Praha 2

### Posudek na disertační práci Mgr. Adama Skarky

Posuzovaná disertační práce Mgr. Adama Skarky, nazvaná „**Účast membránově vázaných enzymů v metabolismu xenobiotik u člověka**“, je koncipována jako ucelená vědecká studie, která je předepsaným způsobem členěna a obsahuje všechny závazné oddíly. Jedná se o prezentaci původních vědeckých výsledků doplněnou souborem tří publikací.

Práce obsahuje 108 stran textu včetně seznamu 201 použitých literárních odkazů. Autor práci až na několik formálních opomenutí a chyb pečlivě sepsal a přehledně rozčlenil na tyto části: Souhrn v českém a anglickém jazyce, Úvod (44 stran), jehož součástí je konkrétně formulovaný Cíl práce, dále Metodickou část (7 stran) a Výsledkovou část ve spojení Diskusí (31 stran), následovanou Závěrem (2 strany). Velmi pozitivně lze hodnotit, že se autorovi podařilo výsledky výzkumu uveřejnit v prestižních mezinárodních časopisech, jejichž souhrnný impaktní faktor je 11,659, a navíc i to, že disertant je v jednom případě prvním autorem.

Teoretická část (Úvod) logicky seřazenými informacemi čtenáře uvádí do oblasti výzkumu biotransformace cizorodých látek v organismu. Po obecnějším úvodu se autor zaměřuje především na velmi důležitou oblast redukčního metabolismu endogenních a cizorodých sloučenin. Pečlivě je probrána klasifikace jednotlivých skupin enzymů, jejich výskyt a metabolické aktivity. Vhodně jsou přičleněny tabulky přehledně shrnující současné poznatky. Volněji navazuje oddíl věnovaný purifikační strategii a hodnocení technik používaných pro jednotlivé separační kroky. Protože právě oblast redukčního metabolismu cizorodých látek je zejména v případě membránově vázaných enzymů dosud jen nedostatečně probádána, zvolil si autor tuto problematiku za cíl své disertační práce.

Metodická část kromě výčtu použitých chemikálií obsahuje podrobný rozpis metodických přístupů, které autor ve své práci aplikoval ke splnění vytčeného cíle. Hlavní pozornost je věnována purifikačním postupům.

Část výsledky a diskuse především formou tabulek a grafů dokumentuje k čemu disertant při řešení jednotlivých dílčích úkolů dospěl. Jedná se o prezentaci výsledků izolace dosud neznámé karbonylreduktasy včetně její charakterizace pomocí měření specifické redukce oracinu. Volbou vhodných chromatografických separací a optimalizací jednotlivých purifikačních kroků se disertantovi podařilo připravit enzymový preparát, který byl vzhledem k výchozímu materiálu až 28,3 x načištěn. Cenné jsou rozhodně výsledky testování katalytické aktivity purifikované karbonylreduktasy vůči vybraným antracyklinům a porovnání naměřených kinetických parametrů s hodnotami získanými v případě mikrosomálních preparátů. Diskuse získaných dat je věcná a bez zbytečných spekulací. Zasaduje výsledky práce do širších souvislostí. Rozsah je adekvátní objemu získaných výsledků. Z prezentovaného objemu dat je patrné, že Mgr. Adam Skarka všechny cíle práce zvládl dobře splnit.

Jako ve většině rozsáhlejších prací, tak i v předkládané disertaci, se vyskytují odborné nepřesnosti a opomenutí, jazykové neobratnosti a formální nedostatky, z nichž si dovoluji některé zmínit:

1. V části Výsledky a diskuse poněkud neorganicky působí přičlenění oddílu věnovaného především literárnímu přehledu a diskusi stereospecifity jako unikátní vlastnosti páru enzym – substrát. Tato část by podle mého názoru vhodně doplnila oddíl Úvodu a připravila čtenáře na formulaci Cíle disertační práce.
2. Práce je pečlivě a přehledně sepsána, neobvyklé je však uvádění číselných údajů bez oddělení mezerou od jednotek. V práci by se neměl objevit zápis – „merkaptotanol“ bez „th“ (str. 51), formulace „primární sekvence“ ve smyslu primární struktura (str. 24), pleonasmus „PAGE elektroforesa“ (str. 50), molekulová hmotnost bez udání jednotek (str. 43) nebo název „sepharosa“, který se uvádí s velkým písmenem. Dobrý vědecký styl disertační práce kazí hovorové obraty, anglikanismy a výrazy laboratorního „slangu“.
3. V práci je chybně považováno pouhé proložení bodů ve výnosech hyperbolou či sigmoidou za „kinetika dle Michaelis-Mentenové“ resp. „sigmoidální kinetika“. Uvádění Hillova koeficientu v případě experimentů prováděných s mikrosomální frakcí, která je sama o sobě velmi komplexní směsí enzymů, je přinejmenším podivné. Nelze též souhlasit s tím, že by jeden z parametrů sigmoidy, nazývaný  $K_{0,5}$ , byl obdobou  $K_m$  (např. str. 79).

K autorovi mám následující dotazy:

1. V teoretické části práce hovoříte o dvou formách DHRS1 odlišné délky (str. 32). Je známo, jaká je jejich substrátová specifika? Souvisí odlišná délka forem s různou schopností inkorporace do membrány endoplasmatického retikula?
2. Vysvětlil byste, jak byla prokázána účast CYP2B4 v králičích plicích mikrosomech na metabolismu alkyl-p-tolyl sulfidů (str. 53). Je známa stereospecifita dalších cytochromů P450 přítomných v plicích?
3. Jaká je chyba (v procentech) při určování chirálního poměru (str. 71)? Mohou frakce FH10-13 vykazovat vlastně „stejnou“ stereospecifitu?
4. Jaké bylo množství proteinu, který bylo aplikováno v případě frakce FH11 na PAGE (str. 72)? Na základě čeho usuzujete, že žádná z detekovaných proteinových zón na gelu nenáleží neznámé karbonylreduktase? Byla provedena MS analýza detekovaných zón?

Uvedená opomenutí a ojedinělé formální nedostatky nikterak nesnižují kvalitu předkládané práce.

Závěrem je možno konstatovat, že Mgr. Adam Skarka prokázal jak velmi dobrou orientaci ve studované problematice, tak schopnost vědecké práce, včetně publikace získaných výsledků v impaktovaných mezinárodních časopisech. Při řešení studované problematiky byly získány originální výsledky naznačující existenci dosud nepopsané mikrosomální karbonylreduktasy. I další výsledky, které prokazují účast tohoto enzymu na redukčním metabolismu xenobiotik, jsou důležitým přínosem k výzkumu přeměn léčiv v lidském organismu.

Předkládanou práci hodnotím jako hodnotnou vědeckou studii, která splňuje požadavky kladené na disertační práce. Vzhledem k těmto skutečnostem doporučuji, aby disertační práce byla přijata k obhajobě a aby na základě úspěšné obhajoby byl Mgr. Adamu Skarkovi udělen akademický titul Ph.D.

V Praze 20.8.2012

Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.