



Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Adama Skarky

“Účast membránově vázaných enzymů v metabolismu xenobiotik u člověka“

Práce se věnuje studiu membránově vázaných enzymů a jejich účasti v biotransformaci xenobiotik. Cílem práce bylo izolovat a purifikovat doposud nepopsaný enzym ze skupiny mikrosomálních karbonyl reduktáz, který se vyznačuje typickou stereospecifitou.

Práce je přehledně a logicky členěna, v úvodu autor vysvětluje v jakém kontextu se jeho výzkum zabývající se membránově vázanými karbonyl reduktázami nachází a stručně charakterizuje obě fáze biotransformace xenobiotik v lidském organismu. Zcela logicky se autor v teoretické části nejvíce věnoval dostupným informacím o enzimech katalyzujících redukci karbonylové skupiny. Autor se ve své práci zaměřil hlavně na aldo-keto reduktázy a jejich účast při biotransformaci vybraných xenobiotik. V poslední části autor stručně charakterizuje separační metody, které lze s úspěchem použít pro izolaci mikrosomálních enzymů.

Ačkoliv se zdá, že je to práce monotématická, jedná se o velice rozsáhlou problematiku, kde dizertant musí prokázat široké znalosti nejen z oboru enzymologie, ale i klinické biochemie, farmakochemie, cytologie a fyziologie, což dokladuje i rozsáhlá literatura, na kterou autor v dizertační práci odkazuje. V práci je citováno celkem 201 literárních odkazů. Komplexní pohled na problematiku enzymů účastnících se biotransformace xenobiotik nechyběl ani při hodnocení a diskuzi vlastních výsledků.

Práce je graficky i formálně velice dobře a pečlivě zpracovaná, což mne, jako oponentovi usnadňuje práci a mohu se nerušeně soustředit na obsahovou stránku dizertační práce. Občas jsem narazila na chybějící mezeru mezi číslem a měrnou jednotkou. Zaskočilo mne vyjadřování aktivity enzymu výrazem „0,35 jednotek“ místo uznávané zkratky U nebo IU.

Cíle práce byly definovány. Celá práce směřovala k izolaci a charakterizaci nového enzymu patřícího do skupiny AKR. Dizertant musel prakticky zvládnout nejen metody stanovení aktivit enzymů, jejich stereospecifity a dalších kinetických parametrů, ale musel si osvojit i metody izolace a purifikace bioaktivních látek spolu s jejich detekcí a kvantifikací

v eluovaných frakcích. Optimalizovaný postup izolace založený na 3 vzájemně propojených separačních krocích byl velice efektivní a z hlediska rutinní aplikace velice perspektivní. Škoda, že se v závěru nepodařilo získat dostatečné množství enzymu ke strukturní analýze pomocí hmotnostní spektrometrie.

K vlastnímu textu práce mám pár připomínek.

K solubilizaci mikrozomů jste použil jako detergent Triton X100, proč právě tento detergent a v té konkrétní koncentraci? Zkoušel jste během optimalizace postupu i jiné typy detergentů, jak dokladuje obrázek 8, můžete vysvětlit průběh naměřených křivek? Diskuze je zde velice stručná, ačkoliv se jedná o významnou část Vaší práce, jak sám uvádíte v závěru. Jaké znáte skupiny detergentů, jak je dělíme a co znamená termín kritická micelární koncentrace?

Kapitola 3. 7. – jaký standard jste použil pro vytvoření kalibrační závislosti a stanovení množství proteinu ve vzorku? Je použití doporučeného proteinu BSA v tomto případě vhodné, jestliže ano, za jakých podmínek?

Při čtení teoretické části mne v některých pasážích zarazilo, že když dizertant popisuje způsob biotransformace xenobiotik a účast vybraných enzymů konkrétně u enzymu NADPH-chinonreduktázy (str. 18), tak se odkazuje na literaturu z roku 2007. Opravdu jsou tyto informace známy tak krátce?

V tabulce č. 13 autor uvádí, že jsou tučně označeny reduktázy, u kterých byl doposud popsán vliv na metabolismus xenobiotik. Označen tučně je ale pouze 1 enzym SDR26C1. Opravdu není u žádných dalších enzymů zmíněných v tabulce zapojení do metabolismu xenobiotik známo?

V rámci otevřené diskuze bych ráda slyšela názor dizertanta na následující otázky:

- V tabulce 2 na straně 13 mne zaujala informace, že induktorem cytochromoxidáz CYP1 je maso grilované na dřevěném uhlí. Můžete mi dizertant konkrétně uvést, o jaké látce indukující aktivitu enzymu se jedná?
- Dovolím si jednu celkem předpokládanou otázku. Proč jste použil pro získání enzymu v dostatečné čistotě klasické metody založené na fyzikálně-chemických principech a nepoužil jste metodu založenou na principu molekulového rozpoznávání? Metodu afinitní chromatografie jste v přehledu separačních metod zmínil. Její výhody tedy znáte. Při izolaci enzymů se používají různé ligandy, mohl byste uvést, jaké ligandy byste navrhl pro izolaci hledané karbonyl reduktázy?

- Jedna otázka bude čistě metodická. Na straně 72 máte obrázek 17, SDS-PAGE analýzu získaných frakcí po izolaci enzymu. Gel obsahuje separované proteiny, kde lze určit jejich molekulovou hmotnost. Přesto separace neproběhla úplně v pořádku a izolované proteiny – proužky - jsou deformované napříč směru separace. Dokážete vysvětlit příčinu rozmývání proužků?

Z předloženého textu dizertační práce jasně vyplývá, že dizertant má v daném oboru rozsáhlé teoretické i praktické znalosti. O kvalitě a významnosti dosažených výsledků svědčí 3 hodnotné publikace v prestižních mezinárodních časopisech (např. IF 3,47 nebo 3,06). Dizertant je u dvou prací druhým autorem, u jedné publikace je autorem prvním. Tak jak je uvedeno v přehledu, výsledky své práce student prezentoval také na mezinárodních konferencích formou posterů.

Závěrem bych chtěla konstatovat, že předložená práce plně dokladuje schopnost autora řešit složité vědecké problémy, využívat nejmodernější postupy a metodické přístupy a tvůrčím způsobem vyvíjet nové. Dizertant splnil cíle vytčené v rámci dizertační práce.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji přijetí práce k obhajobě a po úspěšném obhájení i udělení titulu Ph.D.

V Pardubicích dne 23. srpna 2012

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
Univerzita Pardubice, FCHT
Katedra biologických a biochemických věd