

Oponentský posudek diplomové práce Karla Naimana

Diplomová práce Karla Naimana se zabývá studiem metabolismu *o*-anisidinu a tvorby aduktů *o*-anisidinu a jeho metabolitů jak *in vitro* tak *in vivo*. Tato práce poukazuje na vztah metabolické aktivace tohoto karcinogenu a následného vzniku aduktů DNA, které mohou být příčinou vzniku nádorového bujení. Určení struktury metabolitů *o*-anisidinu a jím tvořených aduktů vede k objasnění karcinogenity této látky. Zvolené téma této diplomové práce je aktuální zejména proto, že *o*-anisidin patří mezi látky znečišťující životní prostředí.

Tato práce obsahuje dobře zpracovaný přehled informací o významu sledování aduktů DNA jako biomarkerů vzniku nádorového onemocnění. Zabývá se tvorbou aduktů DNA, možnostmi jejich oprav i jejich potenciálem ke vzniku mutace. Metody detekce DNA aduktů jsou zde shrnuty opravdu vyčerpávajícím způsobem a autor se jistě velmi dobře orientuje v této problematice, o čemž svědčí i množství literárních odkazů věnované této části práce.

Z uvedených metod byla náročná zejména optimalizace podmínek inkubace a složení reakční směsi, ve které byla sledována přeměna *o*-anisidinu CYP. Tato optimalizace byla složitá hlavně z důvodu rychlého rozpadu či vzájemné interkonverze obou vznikajících metabolitů, což jistě ztížilo i jejich identifikaci. Značnou zručnost a trpělivost vyžadovala také příprava a charakterizace aduktu metabolitu *o*-anisidinu s deoxyguanosem.

Ze zde předkládaných výsledků je patrné, že zadané téma bylo řešeno úspěšně a vytyčené cíle byly splněny. Práce významně přispívá k poznání metabolismu karcinogenu *o*-anisidinu a odhaluje možnou interakci jeho metabolitů s DNA za tvorby kovalentních aduktů. Zajímavé je zejména zjištění, že jeho přeměna CYP směřuje k jeho metabolické aktivaci, tedy ke vzniku nitreniového resp. karbeniového iontu. Přínosem je i zjištění, že adukty tvořené *in vivo* po podání *o*-anisidinu jsou totožné se syntetizovanými adukty *in vitro*.

Po formální stránce je práce členěna obvyklým způsobem a je vhodně doplněna řadou grafů, tabulek, schémat a obrázků. Seznam použité literatury je prezentován v souladu s kladenými požadavky.

K práci mám následující dotazy a připomínky :

1. V kapitole "Metody detekce aduktů" v podkapitole "Fluorescenční stanovení" je uvedeno, že široké píky ve fluorescenčním spektru se dají částečně odstranit chlazením vzorku na 4,2K. Jedná se o překlep nebo je opravdu možné chladit vzorky na tuto teplotu?
2. V podkapitole 4.4. "³²P-postlabeling" uvádíte, že separace značených aduktů se provádí dvourozměrnou iontově výměnnou tenkovrstvou chromatografií na polyethylenimin celulóse. Jedná se opravdu o iontově výměnnou chromatografii?
3. Jak si vysvětlujete nárůst tvorby obou metabolitů *o*-anisidinu, který následuje po poklesu jejich tvorby v důsledku zvyšující se koncentrace *o*-anisidinu v inkubační směsi? Jsou v grafu č. 19 uvedeny výsledky z jednoho experimentu nebo průměry z více stanovení?

4. V kapitole 8.2.4. píšete, že byla sledována tvorba metabolitů M1 a M2 v závislosti na koncentraci N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu v reakční směsi, ale v obrázku č. 23 není metabolit M2 uveden a ani se dále o něm v této souvislosti nezmiňujete. Je možné, že u tohoto grafu je chybná legenda?
5. Měla bych několik dotazů na hmotnostní spektrum majoritního aduktu získaného pomocí HPLC. Iont o m/z 273,1 odpovídá pravděpodobně ztrátě deoxyribosy, nikoli ribosy, jak je uvedeno. Proč se domníváte, že z iontu 257,9 vznikne iont 240,9 odštěpením methoxyskupiny, když diference je 17 hmotnostních jednotek? Proč nebyla provedena fragmentace iontu majoritního aduktu 388,4 ale iontu 273,1?

-
6. Dále bych měla několik drobných připomínek :
Na straně 16, 17, 54, 55 chybí označení strany a strana 56 chybí. V kapitole Výsledky nesouhlasí odkazy v textu na obrázky na straně 40 a 41. EI je zkratka pro electron impact ionization a ESI pro electrospray ionization.

Podle mého názoru předkládaná práce vyhovuje požadavkům kladeným na diplomové práce a proto plně doporučuji, aby byla přijata k obhajobě a navrhuji ji ohodnotit známkou výborně.

V Praze, 12.6. 2006



Mgr. Anna Březinová