

**Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Elišky Kondrové: Studium úlohy
biotransformačních enzymů v chemické karcinogenezi**

Předkládaná práce řeší velmi významnou problematiku zabývající se biotransformačními studiiemi *in vitro*, které jsou nezbytnou součástí toxikologického výzkumu i vývoje nových léčiv, neboť umožňují významnou měrou snížit počet testů na lidských dobrovolnících a poskytují detailnější informace o metabolismu studované látky. Autorka zkoumala možnost využití různých enzymových systémů ke studiu interakcí mezi látkami s motivem chinonu a cytochromy P450. Získané znalosti se snažila aplikovat na vývoj modelového systému pro testování vedlejších účinků anthracyklinových cytostatik, konkrétně doxorubicinu. Limitujícím nežádoucím účinkem tohoto chemoterapeutika je akutní a chronická kardiotoxicita, která je zřejmě způsobena řadou mechanismů (např. ovlivněním homeostázy železa, produkcí reaktivních forem kyslíku a apoptózou). Proto byly následně testovány různé typy flavonoidů, které jsou známy svými antioxidačními účinky a jsou tedy vhodnými kandidáty pro zmírnění nežádoucích účinků anthracyklinových cytostatik.

Po formální stránce je práce členěna způsobem odpovídajícím dizertační práci v rozsahu 91 stran. V úvodu jsou přehledné informace o enzimech biotransformujících xenobiotika a modelových systémech pro studium biotransformace. Dále pak autorka stručně informuje o toxicitě chinonů a flavonoidních sloučeninách.

Cílů práce bylo vytýčeno několik. Za jeden ze stěžejních považuji možnost použití jaterních mikrosomů miniprasat jako modelového systému k testování nežádoucích účinků anthracyklinů.

Metodická část je stručně a přehledně popsána. Myslím si, že v některých případech by bylo vhodnější kromě citace upřesnit i postup, jakým bylo měření prováděno. Z této části je zřejmé, že se autorka seznámila s řadou experimentálních technik.

Výsledková část je doplněna 17 obrázky a 3 tabulkami. Za překvapující výsledek považuji nestabilitu cytochromu P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasy exprimovaných v bakteriálních membrách *E. coli* při inkubaci s NADPH. Tento systém představuje velmi významný model pro studium metabolismu xenobiotik, ale jak se zdá, není příliš vhodný pro studium oxidativního stresu. Proto jako další modelový systém autorka zvolila miniprasečí

mikrosomy, které se ukázaly být vhodné pro studium oxidativního stresu a molekulární toxicity indukované látkami obsahujícími ve své struktuře chinon. Autorka zjistila, že při interakci miniprasečích mikrosomů s doxorubicinem dochází k aktivaci doxorubicinu s následnou zvýšenou tvorbou hydroxylových radikálů. Z testovaných flavonoidních sloučenin byly vybrány fisetin, kaempferol a myricetin, které měly významný inhibiční účinek na tvorbu hydroxylových radikálů vlivem studovaného cytostatika. Tyto látky byly doporučeny k dalšímu studiu v jiných modelových systémech.

Diskuze je poměrně rozsáhlá. Autorka své výsledky srovnává s řadou literárních pramenů a zasazuje do rámce kompletní studie celé pracovní skupiny dr. Součka.

Výsledky dizertační práce jsou součástí publikací ve třech impaktovaných časopisech a jednom časopisu bez IF.

K předkládané práci mám několik připomínek a dotazů:

1. Jaký byl přesný postup při stanovení cytochromu P450? Byla by možná ukázka výsledného absorpčního spektra? Detekovala jste během měření i cytochrom P420?
2. Jak byl stanoven obsah NADPH:cytochrom P450 reductasy (nmol/min) v tabulce 1 a obrázku 9? V metodické části je popsáno pouze stanovení její aktivity.
3. Co znamenají neinkubované mikrosomy v tabulce 2? Můžete vysvětlit, proč jsou směrodatné odchylky v této tabulce tak velké?
4. Proč byly vzorky před elektroforézou centrifugovány a resuspendovány? Jak si vysvětlujete úbytek apoproteinu v mikrosomech? Byl imunochemicky stanoven protein i v supernatantu?
5. Jak si vysvětlujete, že protein na imunoblotu je v případě cytochromu P450 3A destruován v závislosti na koncentraci benzochinonu, kdežto aktivita CYP3A je na jeho koncentraci zcela nezávislá (10 min inkubace bez NADPH).

Uvedené připomínky a dotazy nesnižují úroveň dizertační práce. Předkládanou práci doporučuji k přijetí.

V Praze, dne 23. 5. 2008


RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.