Posudek na dizertační práci Mgr. Radra Indry

Mechanismus enzymové aktivace karcinogenů a léčiv systémem cytochromů P450

Předkládaná dizertační práce se zabývá studiem vlivu složek mikrosomálního monooxygenázového systému na metabolismus benzo[*a*]pyrenu (BaP). Tato látka slouží jako model reprezentující polycyklické aromatické uhlovodíky, které jsou jednou z hlavních kontaminant životního prostředí člověka a díky svým karcinogenním účinkům vyžadují podrobné studium. Jak vědecky tak i společensky se tato dizertace zabývá velmi závažnou problematikou s jistým aplikačním potenciálem v prevenci vzniku nádorových onemocnění. Lze tedy konstatovat, že téma disertační práce bylo zvoleno vhodně a v souladu s nároky kladenými na doktorandské studium.

Hlavní pozitiva dizertační práce.

Teoretická část na dvaceti stránkách, bohatě doprovázených obrázky a tabulkami, uvádí čtenáře do studované problematiky. Velmi čtivou formou je pojata jak oblast karcinogeneze tak i jednotlivých enzymů metabolismu cizorodých látek. Tento přehled působí velmi konsistentně bez zbytečných podrobností a přitom nic podstatného není vynecháno.

Cíle práce jsou jasně stanovené, vyplývají z informací v teoretické části a navržený postup je v souladu s moderními trendy toxikologického výzkumu u nás i ve světě. Velmi vhodně jsou zde propojeny různé *in vitro* a *in vivo* modely od rekonstituovaných systémů přes zvířecí a lidské subcelulární preparáty až po myší knock-out modely. Studium úlohy cytochromu b_5, jeho reduktázy, kofaktoru NADH a tumor supresoru p53 představuje mimořádně zajímavý a unikátní příspěvek.

Výsledková část je koncipována jako výběr nejzajímavějších výsledků, které byly publikovány ve čtyřech recenzovaných článcích v časopisech s impakt faktorem a jednom manuskriptu v revizním řízení. Z přiložených originálních článků a manuskriptu je patrné, že autor udělal ohromný kus práce.

Diskuze je věcná a shrnuje srozumitelnou formou dosažené výsledky. Interpretace výsledků je opatrná a zcela odpovídá skutečnosti. Autor správně vyzdvihuje zásadní zjištění, která jsou jednoznačně podpořena řadou nezávislých experimentů.

Závěry jsou odpovídající dosaženým výsledkům. Mezi hlavní a originální výsledky patří zjištění, že:
1/ metabolismus BaP je závislý na poměru P450/reduktasa a silně jej ovlivňuje i přítomnost cytochromu b_5.
2/ Cytochrom b_5 a jeho reduktasa v přítomnosti NADH jako kofaktoru mohou kompenzovat eventuální absenci P450 reduktasy. Zdá se, že by tento poznatek mohl být univerzální, protože byl potvrzen i na jiném enzymu a substrátu (P450 3A4 vs. ellipticin).
3/ Introdukce lidského p53 v myším modelu stimuluje metabolismus BaP patrně tím, že ovlivňuje inducibilitu P450 1A1.
4/ Potkaní model je možné použít k aproximaci významu metabolické přeměny BaP pro člověka.

Počet překlepů nepřekračuje míru obvyklou u tohoto typu a rozsahu práce. Dizertace působí harmonicky a je pečlivě vypracována po stránce faktické i formální. Zároveň práce

poskytuje dostatek podnětů k diskusi a zamyšlení nad možnými interpretacemi výsledků a budoucím vývojem v oboru.

Čtyři publikace v impaktovaných časopisech a jedna práce v recenzním řízení, na nichž je Mgr. Indra prvním autorem (2x) nebo spoluautorem jsou jasným důkazem, že doktorská práce je mimořádně kvalitní a zasluhuje nejvyšší uznání. Některé z těchto prací budou, díky své originalitě, dle mého názoru, vysoce citovány.

Komentáře a otázky k vlastní práci.

Po formální stránce lze, kromě příležitostných překlepů, vytknout zejména nestandardní způsob uvádění citací v seznamu literatury. Některé časopisy jsou prezentovány zkrácenou formou (např.: cit. 51, 66) jiné vypsány celým názvem (většina), u některých časopisů je uvedeno první slovo velkým a další malým písmenem, u jiných pak všechna první velká (32, 33). Sem tam chybí rozsah stran nebo číslo svazku článku (67, 69, 156), případně je název časopisu/sborníku nesprávný (49, 66, 98).

Příklady překlepů nebo nesprávných formulací:

- str. 20, druhý odst.: … biologická …
- str. 26, první řádek shora: ve větě se vyskytuje dvakrát slovo …zbylých…
- Tabulka 3: Eikosanoidy…
- str. 35, první věta kap. 2.3.2: … jež… a slovo „biotransformovat“ by bylo lépe nahradit slovem …metabolizovat…
- str. 42, zkratka NADPH je chybně uvedena
- str. 43, jméno autora citace č. 130 je správně Yasukochi
- str. 44: v textu druhého odstavce a v dalších popisech extrakce metabolitů chybí specifikace RPM nebo x *g* u hodnoty „13000“
- str. 63: v textu pod tab. 17 je několikrát chybně uveden termín …prokaryotických… nebo …eukaryotických… správně je prokaryotních/eukaryotních
- obr. 22 vs. text na str. 68: v textu se hovoří o modelu Supersomů a v legendě k obrázku pak o E.coli – co je správně?
- str. 77, druhý řádek shora: ve větě začínající „K tomu…“ chybí slovo, např.: provést
- str. 101, druhý paragraf: …adukty s DNA…

Všechny práce přiložené k dizertaci byly recenzovány renomovanými odborníky, a tudíž následující dotazy slouží spíše k podpoření diskuze a k širšímu náhledu na uvedenou problematiku.

1/ Byl tvořen Mx metabolit u HRN myší tak jako tomu bylo u p53 modelu (Obr. 10)?
2/ Jak si vysvětlujete nárůst metabolismu BaP u haploinsuficientního modelu p53+/- (Obr. 11) když oba homozygotní modely byly navzájem srovnatelné? Čím je podle Vašeho názoru způsoben pokles DNA aduktů BaP u p53+/+ modelu ve srovnání se zbylými dvěma modely (Obr. 30)? Má to spojitost s indukcí P450 1A1 nebo spíše se systémem DNA reparace?
3/ V textu na straně 76 výsledky shrnuté na obrázku 29 interpretujete tak, že POR je esenciální pro redukci P450 1A1, ale z obrázku spíše vyplývá, že pro metabolismus BaP je esenciální přítomnost (indukce) P450 1A1 samotného. Navíc experimenty s b_5 a NADH prezentované v dalších kapitolách rovněž ukazují, že přítomnost POR není zásadní pro vznik DNA aduktů BaP. Tomu příliš nerozumím – vysvětlete, jak je to myšleno nebo zda se jedná o překlep.
4/ Obrácený poměr aduktů 1 a 2 vlivem NADH bez b_5 mi přijde velmi zajímavý výsledek (obr. 32) - máte pro to nějaké vysvětlení, resp. hypotézu o možném mechanismu?

5/ Jak byste vysvětlil skutečnost, že lidský i potkaní P450 1A1 bez b_5 v Supersomech tvoří 9-hydroxy BaP (Obr. 14 a 17) a přitom v lidském, na rozdíl od potkaního, systému prakticky nevzniká DNA adukt 1 (Obr. 32 vs. 37) jehož je 9-hydroxy BaP prekursorem (Obr. 27). Navíc v lidských Bactosomech obsahujících lidský P450 1A1 (Obr. 39) nebo v rekonstituovaném systému (Obr. 41) adukt 1 vznikal v poměrně významné míře.

Dizertační práce dle mého názoru splnila svůj účel, protože autor prokázal schopnost samostatné vědecké práce. Výsledky byly publikovány ve velmi kvalitních odborných časopisech.

Z těchto důvodů doporučuji předloženou práci k obhajobě.

V Praze 19.5.2015

doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.