

Zápis z vědecké rozpravy – obhajoba disertační práce Ing. Lenky Hanusové,

ZF JU v Č. Budějovicích, 10.6.2008

- Doc. J. Diviš: Jaká je budoucnost uplatnění inhibitorů proteáz?
- Předpokládám, že v humánní medicíně, léčbě rakoviny a obezity – tam je perspektiva největší. Další možnosti jsou pak v potravinářství, ochraně rostlin.
- Ing. V. Míka: Krátkým varem lze PI inaktivovat, jak je lze pak využít jako aditiv v přípravcích?
- Některé PI jsou extrémně termostabilní, nestabilní proteiny lze formulovat do stabilních přípravků.
- RNDr. I. Prášil: Jedním z cílů práce bylo stanovení odrůdových rozdílů z hlediska obsahu proteinu, mělo by být uvedeno v práci.. V závěru práce jsou uvedeny průkazné rozdílly, v autoreferátu neprůkazné.
- Výsledky obsahu PI u jednotlivých odrůd jsou uvedeny v tabulkách a jsou statisticky vyhodnoceny – správné údaje jsou uvedeny v disertační práci, údaje v autoreferátu již byly opraveny.
- Mgr. S. Sýkorová: Přesnější termín by bylo použití mobilní fáze namísto eluční pufr.
- Toto označení pro mobilní fázi uváděnou v práci jsem našla v publikacích z nichž jsem vycházela.

Odpovědi na otázky v oponentském posudku Ing. Václava Křišťůfka, CSc.

1) Je na místě, aby autorka naznačila možnosti vhodného chemického složení elučního pufu.

V literatuře bývá nejčastěji uváděna kombinace acetonitrilu s kyselinou trifluorooctovou, která jsem rovněž použila. Jako vhodná náhrada bývá zmiňována kombinace methanolu a acetonitrilu. Ani tato kombinace však nesplňuje podmínku pro možnost přímého využití inhibitorů proteáz, izolovaných pomocí HPLC. Jiné chemické složení elučního pufu jsem v odborné literatuře nenalezla.

2) Prosím o vysvětlení, proč není citována práce autorky ve vědeckém časopise s IF.

Článek, který jsem publikovala v časopise Chemické listy, je referátem a shrnují se v něm poznatky, uvedené v literárním přehledu mé disertační práce. Jako vhodnější se mi tedy jevílo citovat původní práce autorů, z nichž sem při tvorbě svého článku vycházela.

Odpovědi na dotazy z oponentského posudku Ing. Václava Dvořáčka, Ph.D.

1) V metodické části uvádí autorka jako návazné statistické hodnocení LSD test. Je tím míněn Fisherův LSD post-hoc test nebo se jedná o nějaký vícerozměrný test, na jehož základě byla určena odrůda Kariera jako cituji „nejméně podobná“ v retenčních časech k ostatním odrůdám? Vyjádření nejméně podobná k ostatním by se totiž spíše hodilo pro nějakou aplikaci vícerozměrné statistické metody typu PCA nebo klastrové analýzy.

Opravdu byl použit Fisherův LSD post-doc test. Formulace, že odrůda Kariera je nejméně podobná ostatním odrůdám, je poněkud nešťastně zvolena. Při použití zmíněné statistické metody by bylo možná lepší formulovat danou skutečnost následovně: Odrůda Kariera vykazovala největší rozdíly k ostatním hodnoceným odrůdám.

2) Proč nebyla v návaznosti na vysokou signifikaci analýzy rozptylu ($p \leq 0,001$) do výsledkové tabulky retenčních časů resp. procentických podílů jednotlivých tříd proteáz rovněž zanesena pomocí písmenných indexů statistická průkaznost pro tyto časy mezi jednotlivými odrůdami?

Statistické porovnání odrůd nebylo primárním cílem a vzhledem k rozsahu výsledkových souborů a pro větší přehlednost jsem se rozhodla detailní popis v rámci disertační práce neuvádět. Uznávám, že mohly tyto údaje být součástí příloh. Pro ilustraci dodávám alespoň jeden ukázkový soubor výsledků Fisherova LSD post hoc testu (viz příloha). Byl vybrán výsledek Fisherova LSD testu pro retenční čas 5 (tj. pro retenční čas skupiny PCPI). V tomto případě se jednalo o retenční časy získané pomocí metody Inhibitory1. V podbarvených políčkách jsou statisticky neprůkazné rozdíly. Zde lze sledovat, že rozdíly mezi hodnotami odrůdy Kariera a všech ostatních odrůd byly statisticky významné. Podobné výsledky byly dosaženy u všech ostatních retenčních časů a procentických obsahů.

3) V metodické části uvedený odkaz (Sýkorová et al. 2006) mimo jiné charakterizuje stav hlíz pro extrakci hlízové šťávy zahrnující jejich optimální vyzrálост, přednostní sklizeň po zaschnutí listů a podmínky skladování. V této souvislosti bych měl dotaz zda je možné očekávat kvantitativní změny inhibitorů proteáz v průběhu skladování hlíz, případně zda toto mohlo mít nějaký dopad na Vámi zjištěné odrůdové difference v podílech těchto proteinů.

Vzhledem k tomu, že inhibitory proteáz slouží jako zásobní bílkoviny v období klíčení, lze očekávat kvantitativní změny v průběhu skladování. Pusztai (1972) prokázal časovou shodu mezi obdobím maximální proteolýzy a obdobím maximálního obsahu inhibitoru proteáz v průběhu klíčení fazolu šarlatového. Některé skupiny inhibitorů proteáz obsahují vyšší podíl cysteinových zbytků na podjednotku a mohou tedy sloužit jako zdroj síry potřebné pro klíčení. Jedná se především o inhibitory proteáz s nižší molekulovou hmotností. Lze tedy očekávat nárůst podílu těchto inhibitory proteáz. Skutečnosti mohly mít vliv na mnou zjištěné odrůdové diference, nelze jednoznačně odpovědět. V žádné práci jsem nenalezla zmínku o takovéto souvislosti. V případě mnou využitých hlíz byly tyto skladovány po stejnou dobu, tudíž nelze ani empiricky potvrdit nějaký vliv doby skladování na rozdíly v procentickém podílu PI's u jednotlivých odrůd.

4) Deklarované statisticky průkazné rozdíly v retenčních časech jednotlivých skupin proteáz u některých odrůd by přiváděly rovněž k myšlence jejich využití jako odrůdové markery. Je toto využití podle Vás teoreticky možné, či budou tyto výsledky více podléhat externím vlivům prostředí a fyziologickému stavu hlíz?

Teoreticky je takové použití možné. Retenční časy u jednotlivých odrůd by neměly výrazně kolísat v závislosti na vnějších podmínkách. Je však nutno dodržet přesně stanovenou metodiku. Problém by mohla představovat pouze skutečnost, že přístroj HPLC použitý pro tuto práci, tj. kapalinový chromatogram Finnigan SpectraSYSTEM Narrow-bore HPLC (High Performance Liquid Chromatography) od firmy Thermo Separation Products, je prototypem a není a nikdy nebyl komerčně příliš rozšířen. Byla by tedy nutná optimalizace na běžnější typ, což by nemuselo být příliš velkým problémem.

Odpovědi na otázky v oponentském posudku Ing. Václava Míky, DrSc.

1) Kladně hodnotím snahu oprostit kapitolu od zabíhání do přílišné šíře a jít raději do hloubky problému. Proč se tu přesto vzpomínají perspektivy využití PI's v lékařství, které s vlastním řešením – ač tématicky nesporně velmi zajímavé – mají málo společného?

Domnívala jsem se, že toto drobné odbočení od tématu by mohlo být zajímavé a mohlo by pomoci zdůvodnit, proč je studium PI's předmět zájmu této i jiných prací. Využití PI's v lékařství se navíc nabízí jako možné řešení pro využívání hlízové šťávy, vzniklé jako odpad při produkci škrobu.

2. Když už se tedy disertantka přece jen rozhodla pojednat o PI's v kladném smyslu, proč se opomíjí jejich jednoznačně negativní působení ve fyziologii trávení, např. u hospodářských zvířat s řadou závažných praktických konsekvencí? Odkaz na ně lze nalézt snad v každé tuctové učebnici výživy!

Z hlediska výživy zvířat se jedná o antinutriční látky v krmivech, neboť PI's vytvářejí s proteolytickými enzymy značně stabilní komplexy, které však už ztratily enzymovou aktivitu.. Tím se snižuje využití dusíkatých látek (NL) v těle zvířete a nestávené NL představují pro životní prostředí navýšení zátěže. (cf. např.: Kalač, P. – Míka, V.: Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. ÚZPI Praha, 1997, 317 s.)

Přehled rolí PI's nebyl míněn jako přehled všech stránek jejich působení. Zde měly být spíše uvedeny přehled jeho rolí v rostlině. Část věnovaná roli PI's v humánní medicíně měla být možná zařazena jako samostatný celek, kdy by se jednalo spíše o přehled možného dalšího využití PI's v případě, že se podaří nalézt vhodnou metodu k jejich izolaci z hlízové šťávy, která vzniká při průmyslovém získávání škrobu. Vzhledem k negativnímu působení PI's v traktu hospodářských zvířat a skutečnosti, že byly zaznamenány pozitivní výsledky při využití PI's v humánní medicíně, jsem svou pozornost zaměřila tímto směrem.

3. V kap. 2.3.1.2. (str. 19) mohlo být řečeno, že v hlízách se PI's nacházejí zejména v kortexu v oblasti klíčku. Slouží jako zásobní bílkoviny v období klíčení.

Tuto skutečnost jsem opomenula uvést. Oblast výskytu PI's je v souladu s jejich funkcí jako zásobních proteinů v období klíčení.



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: **Ing. Lenka Hanusová**
Narozen(a): 19.4.1979 v Jindřichově Hradci

Studijní program: Fytotechnika
Studijní obor: Speciální produkce rostlinná
Forma studia: prezenční

Název disertační práce: **Identifikace inhibitorů proteáz**

Výsledek obhajoby:

Prospěl (a)

Neprospěl(a)

Komise:

	JMÉNO	PODPIS
Předseda:	doc. Ing. Miroslav Jůzl, CSc., MZLU Brno	
Členové:	doc. Ing. Jiří Diviš, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	Ing. Václav Dvořáček, PhD., VÚRV Praha Ruzyně (oponent)	
	prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc., MZLU Brno	
	Ing. Václav Křišťůfek, CSc., ÚPB AV ČR (oponent)	
	prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	Ing. Václav Míka, DrSc., VÚRV Praha Ruzyně (oponent)	
	prof. Ing. Jan Moudrý, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	RNDr. Ilja Prášil, CSc., VÚRV Praha Ruzyně	
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 10.6.2008

