

Univerzita Karlova v Praze, Fyzikální ústav
Oddělení biofyziky
Ke Karlovu 5, CZ-121 16 Praha 2
Tel.: (+420 2) 21 91 13 48 Fax: (+420 2) 24 92 27 97
E-mail: gaskova@karlov.mff.cuni.cz

Posudek školitele na disertační práci **RNDr. Marie Kodedové**
Studium činnosti mikrobiálních MDR pump pomocí fluorescenčních sond: stanovení účinku potenciálních inhibitorů

Rozsah disertační práce Marie Kodedové výrazně převyšuje zadání vypsané před více než čtyřmi lety. Studium činnosti membránových transportérů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* zodpovědných za mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR) a jejich účinná inhibice pomocí chemických stresorů tvoří jen část předkládané práce. Pomocí nově vyvinuté fluorescenční metody dokázala autorka ve své práci problematiku spojenou s rezistencí kvasinek významným způsobem rozšířit o studium mechanismu působení povrchově aktivních látek, které poškozují povrchové struktury buněk (buněčnou stěnu a plazmatickou membránu) a vedou ke smrti mikroorganismů. Tento typ antifungálních léků je v současné době v popředí zájmu při léčbě mykóz, neboť vzhledem ke způsobu, jakým atakují buňky, dokáží překonat problémy spojené s rezistencí mikroorganismů.

Nově vyvinutá fluorescenční metoda pro stanovení mechanismu a rychlosti účinku povrchově aktivních látek je založená na monitorování barvení buněk bezpumpového kmene AD1-3 fluorescenční sondou diS-C₃(3) stejně jako původní verze metody. Narozdíl od původní koncepce, v níž jsou stresory přidávány až k "obarveným" buňkám a zůstávají přítomny ve vzorku, v nové modifikované metodě jsou buňky před měřením barvicích křivek, tj. před přidáním sondy, vystaveny časově omezenému působení stresoru (léku), který je následně odstraněn z média. Tato modifikace umožňuje sledovat na základě vývoje charakteru barvicích křivek průběh "poškození" buněk jak v závislosti na době působení daného léku, tak na použité koncentraci. Jedná se o velmi rychlou diagnostickou a finančně nenáročnou metodu pro vyhledávání nových antifungálních léků účinných při velmi nízkých koncentracích.

Pro získání komplexní informace o účinku chemických stresorů na buňky byly v práci použity rovněž další metody: (1) výsevový test, který poskytuje informace o životaschopnosti buněk vystavených účinku stresorů, (2) zónový test, pomocí kterého lze určit, zda je daná látka substrátem pump, a (3) UV absorpční test pro stanovení výtoku intracelulárních molekul z buněk v důsledku porušení integrity plazmatické membrány.

Kromě řady původních zjištění týkajících se vlivu chemických stresorů na buňky, které se staly součástí řešení několika projektů (grantové projekty GAČR P205/10/1121 a GAUK 7674/2007, výzkumný záměr MSM 0021620835, výzkumné centrum 1M0570 MŠMT), přináší disertační práce i celou řadu dalších výsledků, které mají potenciální praktický dopad. Přestože nebyly dosud všechny výsledky práce publikovány, svědčí 2 články v odborných časopisech a 8 konferenčních příspěvků o jejich značném rozsahu. Mezi nejdůležitější výsledky, které budou v brzké době publikovány, patří bezesporu využití nově vyvinuté metody jako nástroje ke stanovení způsobu inhibice MDR pump různými stresory.

Při řešení úkolů doktorandského studia pracovala RNDr. Marie Kodedová aktivně a cílevědomě. Díky svému neuvěřitelně vysokému pracovnímu nasazení dokázala zvládnout i celou řadu dalších aktivit, které bezprostředně nesouvisely s její vlastní vědeckou prací. Podstatnou měrou se zasloužila o hladký chod biologické a fluorescenční laboratoře (nákup a realizace nových zařízení). Významným způsobem se zapojila rovněž do pedagogického procesu (konzultantka dvou bakalářských prací, asistentka ve Fyzikálním praktiku III - Optika, vedení úloh v Praktiku z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky a v Turnusovém praktiku z biochemie). V neposlední řadě je potřeba rovněž vyzvednout úspěšně dokončený grantový projekt GAUK

7674/2007, kterého byla řešitelkou. Je hlavní autorkou zcela nových výsledků o mechanismu působení povrchově aktivních látek na kvasinkové buňky uveřejněných v jedné z příložených publikací.

Samotná disertační práce svou kvalitou a rozsahem zcela přesahuje rámec běžně podávaných disertačních prací. V teoretické části je čtenáři předložen vyčerpávající přehled dosavadních znalostí o dané problematice psaný dokonalou češtinou. Stejně dokonale jsou zpracovány i zbylé kapitoly disertační práce.

Vzhledem k celkové vysoké úrovni práce, rozsahu a významu dosažených výsledků a stupně jejich prezentace ve významných recenzovaných časopisech doporučuji její přijetí k obhajobě.

V Praze, dne 24. února 2011

Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.
školitelka