

Oponentský posudek na diplomovou práci Andrey Drietomské : Štúdium činnosti kvasinkových MDR púmp pomocou fluorescenčných sond: účinok potenciálnych inhibitorov.

Předkládaná práce se zabývá novou aplikací fluorescenční sondy diS-C₃(3) ke kvantifikaci činnosti MDR pump na modelu kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Cílem práce bylo zhodnotit aktivitu skupiny 12 lyzozomotropních látek na inhibici 2 druhů pump. Předkládaná práce má 65 stran. Členění práce je standardní a přehledné. Trochu jsem jen postrádal více zdůrazněné cíle práce, které jsou uvedeny na str. 32. V teoretické části jsou rozebrány základní otázky týkající se stavby buňky kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, fází buněčného cyklu a růstových fází populace kvasinek. Podrobněji jsou popsány mechanismy které zprostředkovávají mnohonásobnou lékovou rezistenci. Jsou popsány jednotlivé regulační sítě k odstraňování cizorodých látek. Zvláštní pozornost je věnována jednotlivým typům ABC pump, na které byly zaměřeny experimenty. Stručně jsou uvedeny principy tvorby a měření membránového potenciálu buněk. Podrobnější rozbor použití fluorescenční sondy diS-C₃(3), je rozdělen mezi Úvod a Metody. Měřené barvicí křivky ukazují průběh pronikání sondy do buněk v čase. Kvantitativním měřítkem barvení je posun maxima emise sondy vyvolaný vazbou na vnitrobuněčné komponenty. Byly použity kmeny kvasinek které mají nadprodukcii jednotlivých typů pump Pdr5p, Snq2p, Yor1p, nadprodukcii všech tří pump současně a které nemají žádné pumpy tohoto typu. Porovnáváním barvicích křivek kmenů kvasinek s nadprodukovanými pumpami a bez pump je možné od sebe oddělit příspěvek látky ke snížení membránového potenciálu a k potlačení činnosti pump. To se ukázalo jako důležité, protože některé studované látky ovlivňovaly oba příspěvky.

Část Materiál a metody obsahují kromě již zmíněného rozboru metody barvicích křivek i seznam použitých chemikálií a kmenů kvasinek. Dále jsou zde popsány obě klasické metody studia rezistence – zónový test a výsevový test.

Na začátku části Výsledky a diskuse je na příkladu permeabilizace buněk tepelným šokem znovu podrobně vysvětlena metoda barvicích křivek a dále je ověřena na modelových látkách DM-11 a BAC. Výsledky barvicích experimentů s jednotlivými testovanými lyzozomotropními látkami jsou vždy porovnávány mezi kmeny kvasinek, které se liší produkcí pump. Výsledky fluorescenčních pokusů s různými koncentracemi potenciálních inhibitorů jsou vhodně kombinovány se zónovým testem a výsevovým testem, aby se vyjasnilo zda testované látky jsou skutečně substrátem studovaných pump a se sondou kompetují, nebo zda jsou inhibitory transportu sondy jiným mechanismem. U některých zkoumaných látek znemožňovala provedení zónového testu špatná pohyblivost látek v agaru. Výsledky experimentů ukázaly, že přestože některé studované látky skutečně inhibují studované MDR pumpy, jejich praktická použitelnost jako inhibitorů pump je nepravděpodobná pro nutnost použít relativně vysoké koncentrace k dosažení patřičného účinku. Pro použitelnost látek, jako inhibitorů nezáleží na tom, zda látka inhibuje transport kompetitivně, ale na tom zda v účinné koncentraci nepoškozuje buňky jinak – například depolarizací.

Určené cíle práce byly splněny, celkově práci hodnotím jako velmi kvalitní a doporučuji, aby byla hodnocena nejvyšším stupněm.

RNDr. Jan Krůšek CSc.

