

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

RNDr. Karolína Buriánková, Ph.D.

Datum: 30.08.2022

Autor: Bc. Nikola Hloucalová

Název práce:

Vliv adaptačních mutací na vznik perzisterů u *Staphylococcus aureus*

Cíle práce

Podstatou této diplomové práce bylo studium perzistence, tedy schopnosti bakterií přežít antibiotickou léčbu, u kmenů rodu *Staphylococcus aureus* získaných od pacientek s diagnostikovanou cystickou fibrózou. Hlavním cílem bylo objasnit vliv adaptačních mutací u chronologických izolátů na schopnost perzistence po působení třech různých antibiotik využívaných při léčbě pacientů. Dalším cílem bylo stanovit, zda po působení antibiotik v souvislosti s perzistencí dochází k změnám membránového potenciálu a metabolické aktivitě buněk. Velmi zajímavou částí této práce bylo studium vlivu extracelulárních molekul produkovaných do kultivačního média na růstové parametry studovaných izolátů.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 107

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito?

Dostatečné množství pro diplomovou práci s mikrobiologickým zaměřením.

Jsou metody srozumitelně popsány? většinou ANO

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? Převážně ANO, ale v kapitole věnované křivkám hynutí po působení antibiotik je nárůst kolonií na Petriho miskách prezentován nepřehledně.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

– co chybí, v čem je nedostačující?

Parciální cíle této diplomové práce byly splněny, téma perzistence je však velmi komplexní a pro hlubší studium by bylo potřeba klinických izolátů od většího počtu pacientů.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? NE, ale potenciál tohoto tématu je veliký a předběžné výsledky otevírají další otázky.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO, výsledky jsou pečlivě diskutovány a v rámci omezeného množství dostupné literatury dány do kontextu.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Práce je napsaná přehledně a čtivým jazykem, gramatických chyb a překlepů je v textu minimum, většinou v souvislosti s vkládáním citací. Oceňuji vlastní ilustrace vytvořené pomocí programu BioRender. Grafy jsou přehledné.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Studium perzistence je velmi komplexní téma a ač byl tento jev poprvé popsán již více než před půl stoletím, větší pozornost byla doposud věnována bakteriální rezistenci.

Autorka měla k dispozici unikátní klinické izoláty a použila většinu dostupných metod, které se v současné době ke studiu perzistence využívají. Prokázala souvislost mutací v Agr systému se zvýšeným vznikem perzisterů v populaci, otestovala vliv ciprofloxacinu, oxacilinu a vankomycinu na redoxní a membránový potenciál buněk a optimalizovala metodu kontinuálního měření optické denzity ke srovnání vlivu supernatantů obsahujících molekuly z extracelulárního prostředí kultur na rychlost růstu a hynutí buněk a na vyrůstání z perzistence.

Achillovou patou této diplomové práce je nedostatečný počet opakování pokusů, myšleno technických replikátů a pro případnou publikaci i biologických vzorků. Přes tyto nedostatky je tato práce inovativní a přináší velmi zajímavé výsledky s velkým potenciálem pro budoucí studium.

Otázky a připomínky oponenta:

1. V kapitole Akutní a chronický průběh onemocnění uvádíte, že lokálním signálem pro vznik biofilmu je zvýšená koncentrace Mg^{2+} iontů v kostech a ledvinách oproti nižší koncentraci například v srdeční tkáni. O cystické fibróze se zmiňujete pouze okrajově. Je známo jaká je koncentrace Mg^{2+} iontů v plicích zdravých jedinců a pacientů s cystickou fibrózou?
2. U obr. 6 uvádíte v tabulce přehled mutací u jednotlivých chronologicky odebraných izolátů. Jak si vysvětlujete fakt, že mutace přítomné v izolátu 69A a 70A se již nevyskytují v pozdějších izolátech 86A a 86B? Jak homogenní je populace perzistentních buněk během infekce?
3. Je velká škoda, že nebyla možná transdukce plasmidu s reportérovým genem do izolátů první pacientky. Existuje jiná možnost jak vnést vektor do buněk *S. aureus*?
4. Během TD testu došlo k nárůstu perzisterů pouze v případě oxacilinu. Zkoušeli jste testovat i jiné koncentrace u dalších dvou antibiotik tak, aby došlo k selekci perzisterů? Proč jste u vyselektovaných perzistentních buněk netestovali MIC?
5. Na obr. 11 v kapitole Křivky hynutí ukazujete výsevy buněk na Petriho misky po kultivaci s antibiotiky. Proč není na Petriho misce uprostřed, bez přidaného supernatantu, narostlá pozitivní kontrola v čase t_0 , tedy před přidáním antibiotik? Stejně tak na obrázku č. 12.
6. V literárním úvodu se zmiňujete o fenotypu SCV (small colony variants), pozorovali jste tento fenotyp i u vámi selektovaných perzisterů?

Připomínky (netřeba komentovat):

- V materiálech a metodách by bylo vhodné uvádět výslednou koncentraci daných roztoků, ne pouze postup jak roztok připravit.
- Postup transdukce v materiálech a metodách není vysvětlen srozumitelně.
- V diskuzi bych volila raději rozdělení dle studovaného tématu, ne dle použité metody.
- Na str. 48 máte zřejmě chybu o jeden řád v rychlosti centrifugace během izolace plasmidu.
- Na str. 51 popisujete poměrně zdlouhavě promývání buněk od antibiotik. Dále by bylo vhodnější používat trpný rod, ne 3. os. j. čísla.
- Str. 53, první věta nedává smysl.
- V grafu 22 zanikají chybové úsečky v černých sloupcích.
- Během všech pokusů by bylo zajímavé/vhodné testovat též referenční kmen *S. aureus*.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: