

**UNIVERZITA OBRANY**  
**Fakulta vojenského zdravotnictví**  
**Třebešská 1575**  
**500 01 Hradec Králové**

## **OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Student:** Mgr. Aneta Marková  
**Název disertační práce:** Sloučeniny s potenciálními antimikrobiálními účinky  
**Posudek zpracoval:** Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.

Předloženou disertační práci jsem s velkým zájmem prostudoval a dávám o ní následující oponentský posudek. Práce představuje elaborát v rozsahu 102 stran textu a dále 15 stránek příloh. Za důležité považuji explicitní uvedení tří publikací v odborných časopisech s impakt faktorem přímo souvisejících s řešeným tématem. Považuji za vhodné konkrétně uvést tyto časopisy, které patří k uznávaným periodikům s vysokou hodnotou impakt faktoru (IF). Jedná se o European Journal of Medicinal Chemistry (IF 6,514), Toxics (IF 4,146), a Frontiers in Microbiology (IF 5,640). Již tato skutečnost, včetně faktu, že Mgr. Aneta Marková je u jedné publikace první autorkou, svědčí o vysoké kvalitě výsledků získaných v průběhu doktorského studia. Vzhledem k náročnosti oponentního řízení v uvedených odborných periodících je zřejmé, že tato disertační práce splňuje všechna kritéria kladená na disertační doktorskou práci. Nicméně je vhodné, byť v tomto případě vzhledem k výše uvedenému možná nadbytečné, uvést klasický posudek, což činím v následujícím textu.

### **I. K aktuálnosti zvoleného tématu**

Antimikrobiální rezistence (AMR), resp. odolnost bakterií k účinku antibiotik, patří k významným problémům současné medicíny. Nezbytnou součástí terapeutického přístupu k pacientům s bakteriálními infekcemi je aplikace antibakteriálních přípravků. Účinnost antibiotické léčby je však stále více limitována stoupající odolností patogenních bakterií, což výrazně zvyšuje pravděpodobnost selhání antibioterapie a s tím související morbiditu i mortalitu pacientů. Považuji za nutné zdůraznit, že problém AMR není jen medicínský, ale měl by být charakterizován jako problém celospolečenský, který začíná limitovat další rozvoj diagnostických a léčebných postupů v klinické medicíně snižováním jejich úspěšnosti v souvislosti se zvýšenou morbiditou a mortalitou infekčních komplikací s etiologickou rolí multirezistentních bakterií. Významnost tohoto problému se zvyšuje s požadavkem adekvátní léčby závažných bakteriálních infekcí, především u pacientů v intenzivní péči. V případě těchto pacientů je nutné podat antibakteriální přípravek co nejdříve, optimálně v rozsahu hodin (v závislosti na diagnóze). Během tak krátké doby však není možné přesně určit etiologické agens a jeho citlivost k antibiotikům. Na druhé straně však nasazení adekvátní, resp. účinné, antibiotické léčby může významně přispět k pozitivnímu terapeutickému efektu u konkrétního pacienta. V odborné literatuře je celá řada prací jednoznačně dokladujících vyšší mortalitu v případě rezistence bakteriálního původce na iniciální antibiotickou léčbu. Vzhledem ke zvyšování odolnosti bakteriálních patogenů je

zřejmé, že je nutné vyvíjet nová antibakteriální léčiva. V současné době je však, bohužel, vývoj rezistence bakterií k antibiotikům výrazně rychlejší než zavádění nových antibiotik do praxe.

Z výše uvedeného vyplývá, že téma předložené disertační práce, vývoj nových antimikrobiálních látek, je vysoce záslužné, aktuální a plně zapadá do současných prioritních témat v medicíně.

## II. Ke zvoleným metodám disertační práce

K řešení zvolených cílů použila autorka aktuální metodické postupy, přičemž použila zásadně těch postupů, které byly pro vyřešení úkolu neoptimálnější a nejpřesnější.

Konstatuji, že celková metodologická struktura disertační práce zcela vyhovuje řešení zvoleného problému.

Použitá dokumentace (tabulky, obrázky, schémata, grafy) je na místě, přesně a výstižně osvětluje řešené téma, metodické postupy i vlastní výsledky práce.

Výběr citovaných pramenů je bohatý, dobře volený a svědčí o vynikajícím rozhledu autorky ve studované problematice.

## III. K vlastním výsledkům disertační práce

Jsem zcela přesvědčen, že získané výsledky jsou velmi hodnotné a přispívají k poznání v oblasti nových antibakteriálních látek v mezinárodním měřítku.

Výsledky byly prezentovány ve formě tří publikací v časopisech s impakt faktorem a tuto skutečnost považuji za vhodné znovu zdůraznit. Náročnost recenzního řízení v těchto odborných periodících jednoznačně potvrzuje vysokou kvalitu získaných výsledků. Dále jsou tyto práce dle WOS již citovány (k 4.5.2022 celkem 13 citací), což dokumentuje zájem odborné veřejnosti o uveřejněné údaje. Konkrétně se jedná o následující práce:

1. Soukup, O; Benkova, M; Dolezal, R; Sleha, R; Malinak, D; Salajkova, S; Markova, A; Hympanova, M; Prchal, L; Ryskova, L; Hobzova, L; Sepcic, K; Gunde-Cimerman, N; Korabecny, J; Jun, D; Bostikova, V; Bostik, P; Marek, J. The wide-spectrum antimicrobial effect of novel N-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures; the QSAR study against bacteria. EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 2020, 206:112584, DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112584, IF 6,514, Q1, 10x citováno k 4.5.2022
2. Hympanova, M; Terlep, S; Markova, A; Prchal, L; Dogsa, I; Pulkrabkova, L; Benkova, M; Marek, J; Stopar, D. The Antibacterial Effects of New N-Alkylpyridinium Salts on Planktonic and Biofilm Bacteria. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, 2020, 11:573951, DOI: 10.3389/fmicb.2020.573951, IF 5,640, Q1, 2x citováno k 4.5.2022
3. Markova, A; Hympanova, M; Matula, M; Prchal, L; Sleha, R; Benkova, M; Pulkrabkova, L; Soukup, O; Krocova, Z; Jun, D; Marek, J. Synthesis and Decontamination Effect on Chemical and Biological Agents of Benzoxonium-Like Salts. TOXICS, 2021, 9:222, DOI: 10.3390/toxics9090222, IF 4,146, Q2, 1x citováno k 4.5.2022

V souvislosti s řešením předložené disertační práce byly podány dvě patentové přihlášky, které jsou momentálně v řízení Úřadu průmyslového vlastnictví České republiky.

#### IV. Připomínky oponenta

K předložené disertační práci mám 4 připomínky a 7 dotazů. Připomínky však v žádném případě nesnižují vysokou vědeckou hodnotu předložené práce. Dotazy pak vyplývají ze skutečnosti, že mne výsledky velmi zaujaly a rád bych položené otázky diskutoval při vlastní obhajobě.

##### Připomínky

1. Problém AMR je bezesporu spojen s aplikací antibiotik, ale nelze jej spojovat pouze s tímto parametrem. Neméně důležitou příčinou stoupající hrozby AMR jsou rekombinační bakteriální mechanismy (např. šíření plasmidů pomocí konjugace) a klonální šíření identických bakteriálních patogenů.
2. Termín „antibiotická politika“ je v uvedeném významu typický pro Českou republiku. V ostatních zemích se jedná spíše o aplikaci „Antibiotic stewardship“, což je významově poněkud jiný termín.
3. Některé názvy bakterií nejsou zcela přesné, například *Chlamydia psittaci* (správně *Chlamydophila psittaci*) a *Salmonella typhi* (správně *Salmonella enterica* subsp. *typhi* nebo zkráceně ve tvaru *Salmonella* Typhi, v tomto případě se jedná o označení sérovaru a nikoliv species).
4. Bakteriální kmeny s produkcí širokospektrých beta-laktamáz se označují jako beta-laktamáza pozitivní, nikoliv „produkující B-laktamázy“.

##### Dotazy

1. Prosím o upřesnění, jak byla stanovena MBC. Z uvedené metodiky není zřejmé, do jakého média byly jamky bez růstu vyočkovány. Byla použita pevná nebo tekutá půda?
2. K testování účinku KAS na vytvořený biofilm byly použity kmeny *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus mutans*. Jak bylo potvrzeno, že tyto izoláty vytváří biofilm? Proč nebyl použit standardní referenční kmen, například *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 (tedy kmen s *ica* operonem a definovanou produkcí biofilmu).
3. Prosím o upřesnění, jak byl vytvořen bakteriální biofilm na víčku mikrodestičky.
4. V metodice je uvedeno, že byly použity bakteriální kmeny označované jako C1923, C1936, A1235, C1950, A1245 a C1914. O jaké označení se jedná? Jsou to standardní referenční kmeny? Pokud se nejedná o standardní (tedy běžně dostupné) bakteriální kmeny s definovanými vlastnostmi, jak byly stanoveny deklarované vlastnosti použitých kmenů (např. produkce ESBL, rezistence k methicilinu či vankomycinu) a jak tyto byly potvrzeny.
5. Testovaný vankomycin-rezistentní enterokok není definován vůbec, je uvedeno jen „Vancomycin-rezistentní *Enterococcus*“. Není možné uvádět jen termín *Enterococcus*, minimálně musí být uvedeno *Enterococcus* sp. O jaký kmen, resp. species, se jednalo (*Enterococcus faecium* či *Enterococcus faecalis* se sekundární rezistencí nebo

*Enterococcus casseliflavus* či *Enterococcus gallinarum* s primární rezistencí k vankomycinu)? V dalším textu je sice zmínka o *Enterococcus faecalis*, ale bohužel to není zřejmé.

6. V disertační práci je uváděna primární a sekundární rezistence ke KAS. V této souvislosti bych se rád zeptal, jaká bakteriální species jsou primárně rezistentní k účinku KAS? V případě polypeptidů (podobný mechanismus účinku) to jsou například kmeny *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri* nebo *Morganella morganii*, platí to i pro KAS?
7. Autorka disertační práce uvádí, že KAS jsou účinné především na grampozitivní bakterie, nicméně je zde účinnost i na některé gramnegativní bakterie, například *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Tuto skutečnost zdůvodňuje přítomností zevní membrány u gramnegativních bakterií. Ale ta je přítomna i u zmíněných citlivých species *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Proč je tedy uváděna vyšší rezistence u dalších gramnegativních bakterií? Pokud se podíváme na polypeptidy (např. kolistin), tak tyto antibakteriální látky rovněž působí na zevní membránu většiny gramnegativních bakterií (podobný mechanismus účinku jako KAS) a tento účinek je baktericidní. Samozřejmě je skutečností, že daptomycin s účinkem pouze na grampozitivní bakterie a podobnou aktivitou na cytoplasmatické membráně nefunguje na gramnegativní bakterie. Ale to není způsobeno tím, že zevní membrána chrání gramnegativní bakterie, ale zřejmě obsahem negativně nabitého fosfolipidu. Jinými slovy, zdůvodnění skutečnosti, že gramnegativní bakterie jsou více odolné k účinku KAS bude zřejmě poněkud složitější a není to otázka jen prosté přítomnosti zevní membrány. Prosím o komentář k této problematice.

## V. Závěr

**Mgr. Aneta Marková ve své disertační práci jednoznačně prokázala, že umí vědecky pracovat, tj. definovat závažný problém, racionálně si vymezit cíle studia, teoreticky i metodicky řešenou problematiku zvládnout a určit význam výsledků pro další poznání v teorii i praxi. Navíc je nutné ocenit, že získané výsledky byly publikovány v prestižních odborných časopisech s vysokým impakt faktorem a zařazených do prvního či druhého kvartilu.**

**Z výše uvedených důvodů doporučuji předloženou disertační práci k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby udělit Mgr. Anetě Markové akademický titul Ph.D.**

V Olomouci dne 4. května 2022

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.