

POSUDEK ŠKOLITELE STUDENTA K OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE

Student: Mgr. Michaela Hympánová
Školitel: PharmDr. Jan Marek, Ph.D
Školitel-specialista: RNDr. Markéta Benková, Ph.D.
Studijní program: Lékařská mikrobiologie
Forma studia: prezenční
Ročník: 5.

Název disertační práce:

Hodnocení antimikrobiálního účinku látek typu kvartérních amoniových solí

Mgr. Michaela Hympánová před započítím svého doktorského studia studovala magisterské studium v oboru Farmacie na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze. S těmito vhodnými předpoklady zahájila své doktorské studium na Katedře epidemiologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Brně (FVZ UO) v roce 2018 v oboru lékařské mikrobiologie na tématu, který si po dohodě s vedoucím práce sama zvolila. Mgr. Hympánová dokázala skloubit své studijní a vědecké povinnosti se svým částečným pracovním vytížením mimo Katedru epidemiologie (pozice výzkumného a vývojového pracovníka na Centru biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové a farmaceuta v lékárně) a formou spolupráce využila propojení pracovišť ke zkvalitnění výsledků její vědecké práce. Mgr. Michaela Hympánová se po celou dobu doktorského studia jevila jako nekonfliktní, samostatný a manuálně velmi zručný vědecký pracovník. Studijní povinnosti vždy plnila ve stanovených termínech. Nicméně na konci 4. ročníku studia požádala o prodloužení studia z důvodu vyššího pracovního vytížení mimo UO a z důvodu delšího přerušení práce během pandemie Covid-19.

Název práce: **Hodnocení antimikrobiálního účinku látek typu kvartérních amoniových solí** umožnil Mgr. Hympánové nejen rutinní testování látek tohoto typu, ale především rozvoj dalších pokročilých metodik na pracovišti. K aktuálnosti potřeby nových dezinfekčních látek se v dnešní době nelze než pozitivně vyjádřit. I když kvartérní amoniové soli (KAS), kterými se studentka ve své práci plně věnuje, nepatří mezi nejúčinnější skupiny látek používaných v praxi k dezinfekci, jejich použití vzhledem k pozitivním fyzikálně-chemickým a nízkým cytotoxickým vlastnostem je stále aktuálnější. Ne zcela specifický mechanismus účinku pak relativně znesnadňuje vznik častých rezistencí, jako je tomu např. u antibiotik.

Práce je přehledně členěna dle doporučených osnov. V teoretické části byly přehledně sepsány části týkající se obecně kvartérních amoniových solí, jejich mechanismu účinku a použití. Dále část věnovaná speciálním biokompatibilním materiálům a další prostředky obsahující tuto skupinu látek a jejich použití, a následně kapitola o složení a vzájemné komunikaci bakterií ve formě biofilmu.

V experimentální části jsou na začátku jasně definovány cíle práce a následně podrobně popsána jejich řešení. Látky připravené ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie FVZ UO a Centrem biomedicínského výzkumu FNHK jsou předmětem dlouhodobějšího výzkumu v této

oblasti a byly vytipovány na základě předchozích zkušeností. U látek byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) pro osm druhů bakterií (4 Gram poz., 4 Gram negat.). K základnímu antibakteriálnímu testování byla použita mikrodiluční bujonová metoda, která sice není ideálně vhodná pro testování dezinfekčních látek (vzhledem k časovým úsekům), ale jako základní screening účinnosti většího množství látek a stanovení použitelné koncentrace je zcela dostačující. Kromě rutinního testování jsou zde popsány další pokročilé metodiky jako testování nejúčinnějších látek dle normy ČSN EN 1276, jako jeden z hlavních faktorů nutných pro uvedení látky do praxe. Další testování pomocí průtokové cytometrie na vakcinačním kmeni *Francisella tularensis*, jako vybraném simulantu biologických bojových látek. Další metodikou je pak hodnocení tzv. minimální biofilm-eradikující koncentraci. V rámci své zahraniční stáže pak využila k hodnocení látek pokročilý biofilmový model *E. faecalis*, kde sledovala vliv kombinovaného působení laserových paprsků a testovaných látek. V rámci spolupráce se středoevropským technologickým institutem v Brně (CEITEC) pak popisuje metodiku kultivace a hodnocení biofilmu na speciálních biokompatibilních materiálech z fosforečnanu vápenatého.

Shrnutím experimentálního obsahu práce je tedy to, že Mgr. Hympanová otestovala více než 80 látek na bázi KAS (s tím, že do disertační práce si zvolila jen ty nejvýznamnější výsledky), zhodnotila jejich působení na široké spektrum bakteriálních kmenů (Gram pozitivní, Gram negativní). Z tohoto screeningu vytipovala nejúčinnější a nejvhodnější látky, které byly následně podrobeny pokročilým testům dle evropské legislativy (ČSN EN 1276), dále hodnocení účinnosti proti bakteriálním biofilmům případně další hodnocení pomocí zavedených výše popsaných speciálních metodik. V rámci legislativní zkoušky byly použity sbírkové kmeny pro jednodušší porovnatelnost výsledků a krátké expoziční časy pro přiblížení experimentálních podmínek ke klinické praxi. Dále byla u nejlepších látek stanovena účinnost proti *F. tularensis* pomocí metodiky průtokové cytometrie (FACS) zavedené a optimalizované na pracovišti FVZ UO, která simulovala testování látek na modelu biologicky zneužitelného kmene jako zbraně hromadného ničení. Navíc byla u nejlepších látek stanovena účinnost proti biofilmu *S. aureus*, *E. coli* a *S. mutans* pomocí CBD metodiky, která byla na pracovišti FVZ UO rovněž zavedena a optimalizována. V návaznosti na získané výsledky byla v rámci zahraniční stáže na Univerzitě v Lublani u vybraných látek hodnocena antibiofilmová aktivita a efekt kombinované léčby KAS a Er:YAG laseru na pokročilejším modelu biofilmu *E. faecalis*. A v neposlední řadě byl na základě získaných zkušeností zaveden na domácím pracovišti model biofilmu na biokompatibilním povrchu fosforečnanu vápenatého, jakožto modelu zubního biofilmu. Mgr. Hympanová se tak významně podílela na řešení několika projektu např. AZV – NV18-09-00181 – Vývoj polyvalentního dekontaminačního činidla, NV19-09-00198 -Vývoj nových látek na bázi kvartérních amoniových sloučenin proti mikrobiálním biofilmům ústní dutiny dále SV/FVZ 201905 – MBEC assay: Modifikace metodiky pro vybrané bakteriální kmeny a jejich případnou kombinaci a interní projekt FNHK 2021 – Model zubního biofilmu pro hodnocení účinku zubních dezinficiens.

Dále, jak už bylo zmíněno, bych rád připomenul, že Mgr. Hympanová se zúčastnila čtyřměsíční zahraniční stáže na Biotechnologické fakultě Univerzity v Lublani v rámci programu Erasmus+, kterou si sama zvolila i samostatně zařídila a vykomunikovala. V rámci stáže se naučila novou metodiku hodnocení antibiofilmového účinku v kombinaci s laserovým působením, kterou úspěšně aplikovala pro testování nových látek a výsledky následně publikovala. Během studia také

absolvovala několik zahraničních i tuzemských konferencí s aktivní účastí (3 přednášky, 5 posterů). Z vlastní iniciativy se rovněž účastnila několika tuzemských vzdělávacích kurzů, stáží a škol.

Závěrem bych chtěl shrnout, že dle mého názoru Mgr. Michaela Hympánová přinesla výše popsanému problému mnoho odpovědí a posunula danou výzkumnou oblast na pracovišti o značný kus dopředu především, co se týče zavedeného portfolia nových metodik a spoluprací. Danému problému porozuměla a s trpělivostí ho řešila a samostatně rozvíjela. Výsledky její práce se odrážejí na počtu jejích publikačních výstupů, kterých má nad stanovený rámec. Je první autorkou 3 publikací v recenzovaných časopisech (2x s IF) a 4 publikací jako spoluautor (3x s IF, 1x recenz.), které se týkají přímo jejího tématu disertační práce. Navíc je spoluautorkou jednoho patentu a jednoho užitého vzoru. Dle hodnocení metodiky Web of science (WOS) má k dnešnímu dni 28 citací (bez autocitací) a H-index 2, což považuji u obhajujícího Ph.D. studenta za obvyklé.

Závěrem lze dodat, že předložená disertační práce je v souladu s vnitřními předpisy Univerzity Obrany (předpis rektora UO č. 3/2018) a proto jí bez námitek **doporučuji k obhajobě**.

Datum:3.4.2023.....

Podpis školitele:.....