

## Oponentský posudek na dizertační práci

<u>Název dizertační práce:</u>	Charakterizace antibakteriálního potenciálu nově syntetizovaných látek a bakteriálních společenství
<u>Autor:</u>	Mgr. Adéla Diepoltová
<u>Školitel:</u>	prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
<u>Konzultantka:</u>	RNDr. Klára Konečná, Ph.D.
<u>Oponent:</u>	doc. PharmDr. Ivona Pávková, Ph.D.
<u>Pracoviště oponenta:</u>	Univerzita obrany, Vojenská lékařská fakulta

Ve své dizertační práci se Mgr. Adéla Diepoltová věnuje vysoce aktuálnímu tématu antimikrobní rezistence. Experimentální část zahrnuje optimalizaci modelu pro tvorbu bakteriálního biofilmu v *in vitro* podmínkách pro testování antibiofilmové aktivity nových antimikrobních látek a dále biologické a mikrobiologické analýzy nových látek s potencionálním antimikrobním účinkem. Vystihuje zde zásadní problém, se kterým se lidstvo v oblasti zdravotnictví v posledních letech potýká - což je výrazný nárůst bakteriálních kmenů rezistentních na dostupná antibiotika na jedné straně a na straně druhé pomalý vývoj nových antimikrobně působících látek, případně strategií, které by pomohly tento stav zvrátit nebo alespoň zpomalit. Tuto problematiku autorka výstižně popisuje v teoretické části své práce.

Zvláště je třeba vyzdvihnout a ocenit tu část práce, která se zaměřuje na problematiku mikrobiální biofilmů a zavedení validního modelu pro *in vitro* testování anti-biofilmového účinku látek. Tato mikrobiální společenství mohou být zásadní příčinou selhání terapie, což je dnes v rámci základního screeningového testování nových látek prakticky opomíjeno, nejspíše z důvodu náročnosti provedení a absence standardizovaných testovacích modelů. Autorka poukazuje na zásadní nedostatky modelů popisovaných v publikovaných studiích a sleduje základní charakteristiky biofilmů v závislosti na jednotlivých kultivačních podmínkách. Z výsledků a pozorování této studie je zřejmé, že mikrobiální společenství jsou velmi dynamická a mohou výrazně měnit své vlastnosti v závislosti na okolních podmínkách. Ve finále se nabízí otázka, zda je vůbec možné tuto metodiku tzv. standardizovat. Autorka nicméně poukazuje na veškerá zásadní úskalí tohoto experimentálního přístupu a zdůrazňuje, že je nutné model vždy optimalizovat pro konkrétní kmen daného mikroorganismu. Tuto část práce považuji za vysoce přínosnou, inovativní a s velkým aplikačním potenciálem.

Dizertační práce je sepsána velmi kvalitním a srozumitelným jazykem, prakticky bezchybně, formálně je na vysoké úrovni. Ve své strukturní podstatě je práce rozdělena na část teoretickou, která obsahuje extensivní seznámení s danými tématy (antimikrobní rezistence včetně základního popisu známých rezistentních patogenů, alternativní přístupy ve výzkumu antiinfektiv, mikrobiální biofilmy a přehled metodik pro hodnocení antimikrobní aktivity kandidátních látek). Část experimentální je rozdělena do tří nezávislých, tématicky souvisejících částí (označené jaké cíle A, B, C). Každá část je věnována jasně definovanému cíli práce a obsahuje úvod, pracovní hypotézu, metodiku, průběžně diskutované výsledky doplněné adekvátní obrazovou a tabulkovou dokumentací a závěrečné shrnutí. Vzhledem k charakteru práce, přispívá tento způsob členění k vyšší přehlednosti, na druhou stranu však dochází, zejména v úvodních pasážích jednotlivých cílů, k častému opakování faktů a myšlenek, které jsou již popsány v teoretické části. Kromě celkového závěru je zde zařazena ještě kapitola souhrnná diskuze, která by však svým obsahem a absencí literárních odkazů odpovídala souhrnu dosažených výsledků.

První cíl práce je věnován již zmiňovaným biofilmům. Následuje část zabývající se testováním nově syntetizované látky na bázi 2-aminoxazolu (s označením AB-15) jako potencionální adjuvantní

látky pro kombinační terapii. V rámci třetího cíle byl testován antimikrobní potenciál látek přírodního původu, alkaloidů z rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. I tyto dvě části přinášejí zajímavé a přínosné výsledky. Antimikrobní aktivita látek byla sledována základními *in vitro* přístupy na skutečně pestrém spektru bakteriálních kmenů sbírkových i klinických izolátů. Kromě toho byl proveden i základní screening antimykobakteriální a antifungální aktivity. U vybraného kmene byl analyzován i možný interakční účinek s běžně dostupnými antibiotiky. Další testování látek zahrnovalo i základní *in vitro* hodnocení účinku na proliferaci jedné vybrané buněčné linie. Zde by bylo vhodné provést ověření ještě i na dalších typech buněčných kultur a dalšími běžně dostupnými testy, včetně testů na genotoxicitu. To je zde však vyváženo aplikací bezobratlého zvířecího modelu, s využitím larev *Galleria mellonella*, což posunuje testování toxicity na *in vivo* úroveň. U látky AB-15 byla ověřována i antibiofilmová aktivita a byla provedena i prvotní studie směřující k určení mechanismu účinku testované látky. Souhrnně lze konstatovat, že u obou typů testovaných látek se podařilo prokázat jejich antimikrobní účinek, nízkou toxicitu a za určitých podmínek i synergický efekt a tím potvrdit jejich potenciál pro další výzkum v oblasti nových antiinfektiv.

Výsledky dizertační práce byly prezentovány formou prezentací i přednáškových sdělení a jsou součástí celkem 6 publikací v impaktovaných časopisech, kde v jednom případě je Adéla Diepoltová první autorkou.

K práci bych měla následující dotazy:

- K cíli A (zavedení přístupu pro tvorbu stafylokokových biofilmů): V rámci testování různě modifikovaných kultivačních médií se ukázala suplementace lidskou krevní plazmou výhodnější v porovnání s použitím inaktivovaného fetálního bovinního séra. Měla byste pro to nějaké možné vysvětlení?
- V rámci cíle A se Vám podařilo optimalizovat tvorbu biofilmu na kolíčcích uzavřeného biofilmového modelu. Proč nebyl tento systém také použit pro testování antibiofilmové aktivity látky AB15?
- Z textu cíle 2 nevyplývá zcela jasně kdo, případně na jakém pracovišti byla připravena látka AB-15 pro testování v rámci této práce.
- K cíli 3 – testovány jsou zde deriváty montaninového typu připravené modifikací alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Alkaloidy rostlin této čeledi jsou obecně známy pro svůj cytotoxický účinek na eukaryotické buňky. Vámi testovaná látka prokázala jen nízkou toxicitu. Můžete blíže vysvětlit?
- K testování antimykobakteriální aktivity látek v rámci cíle 2 a 3 byly použity kmeny řazené aktuálně do rodu *Mycobacterium*, dále atypické mykobakteriální kmeny a kmen *M. tuberculosis* H37Ra. Posledně zmíněný označujete jako avirulentní, v jiných zdrojích je označován jako atenuovaný. Jak dalece jsou tyto kmeny porovnatelné s virulentními kmeny *M. tuberculosis* (z pohledu interpretace získaných výsledků)?
- Při porovnání stanovovaných MIC - hodnoty testovaných látek jsou výrazně vyšší (až o řád) v porovnání s hodnotami standardně používaných antibiotik. V kontextu s tím vyvstává otázka, zda existují nějaká „hraniční“ kritéria (limitní hodnoty), do kterých lze antimikrobní účinek považovat za skutečně přínosný.
- Bakterie disponují tzv. CRISPR/cas systémem, který našel dnes využití i v oblasti molekulární biologie. Má tento systém také nějakou souvislost s bakteriální rezistencí?

Dizertační práce splňuje veškerá kritéria a požadavky, lze ji hodnotit jako velmi pěknou a přínosnou. Mgr. Adéla Diepoltová jasně prokázala způsobilost k samostatné vědecké práci. Závěrem disertační práci **doporučuji k obhajobě**.

V Hradci Králové, dne 27. 5. 2024

Doc. PharmDr. Ivona Pávková, Ph.D.