

## **Oponentní posudek**

Disertační práce

**Mgr. Adéla Diepoltová**

vypracované na téma

### ***Charakterizace antibakteriálního potenciálu nově syntetizovaných látek a bakteriálních společenství***

Předložená disertační práce je věnována aktuální problematice antimikrobiální rezistence a tvorbě mikrobiálního biofilmu, což jsou dvě úzce související oblasti, které představují značné výzvy v léčbě bakteriálních infekcí. Z mého pohledu má práce vysoký potenciál uplatnění v aplikovaném sektoru, jelikož pokroky v oblasti vývoje nových aktivních molekul jsou nezbytné pro efektivní boj proti nově se vyvíjejícím multirezistentním kmenům. Tyto kmeny totiž často disponují zvýšenou schopností tvorby biofilmu a výměny genetického materiálu, včetně genů pro rezistenci. Právě metabolismus buněk a struktura biofilmu ovlivňuje průnik a vliv aktivní antimikrobiální látky do cílového místa patogena.

Vlastní práce je rozdělena do dvou stěžejních oblastí, a to na optimalizaci a standardizaci tvorby biofilmu u grampozitivních bakterií patřící do rodu *Staphylococcus*, představující vysoce metabolicky aktivní druhy bakterií produkující řadu exoenzymů a toxinů a vyvolávající závažné pyogenné infekcí u lidí a zvířat. Druhá část se zabývá studiem vlivu nově syntetizované aktivní molekuly na bázi chlorovaného derivátu 2-aminooxazolu a přírodní látky montaninového typu rostlinného původu získané z alkaloidů vykazující antimikrobiální aktivitu vůči širokému spektru vybraných testovaných kmenů.

Disertační práce je zpracována v českém jazyce. Jazyková úroveň práce je velice dobrá. Práce má rozsah 178 stran, je členěna do několika kapitol, zahrnující teoretickou část, experimentální metody a jednotlivé cíle práce. Cíle jsou přehledně rozděleny do třech podkapitol. Na konci každé kapitoly jsou souhrny výsledků, a to činní práci velmi srozumitelnou a přehlednou. Jako přílohy autorka přikládá 10 přednáškových a plakátových sdělení a dále je připojen seznam 4 článků publikovaných v mezinárodních recenzovaných časopisech. Publikované články a účasti na vědeckých mezinárodních konferencích dokumentují experimentální zručnost, znalost a schopnost autorky prezentovat své výsledky a obhájit je i v recenzním řízení v mezinárodních časopisech hodnocených Q2. Tyto schopnosti převyšují standartní znalosti průměrného studenta doktorského studia.

Úvod disertační práce zahrnuje literární přehled, který odpovídá rozsahu experimentální části práce. V první části se autorka zaměřila na problematiku antimikrobiální rezistence, konkrétně mechanismy rezistence a na kombinační terapie. Druhá sekce je zaměřena na charakteristiku skupiny bakterií sdružené pod akronym ESKAPE vykazující vysokou virulenci a značnou míru rezistence. Z pohledu faktorů virulence bakteriálních kmenů autorka cílí na strategii tvorby bakteriálního biofilmu, jeho vizualizaci, roli při infekčních onemocněních a na jeho následnou eradikaci pomocí cílené lékové terapie. V závěrečné části jsou pak rozepsány jednotlivá hodnocení antimikrobiální aktivity látek, jako např. stanovení minimální inhibiční koncentrace, biologické vlastnosti látek a studium vlivu kombinace léčiv a adjuvantních látek. Z mého pohledu je literární rešerše obsáhlá a přehledná, autorka ukázala zájem a přehled o danou problematiku což potvrzuje 190 citovaných původních prací. Nicméně pár připomínek

bych k této sekci měla. Vzhledem k zaměření práce mně v literárním přehledu chybí detailnější popis mechanismů tvorby biofilmu a mechanismus účinku vybraných antimikrobiálních látek zaměřený na konkrétní cílové struktury či metabolismy mikroorganismů.

Po formální stránce lze v některých případech vytknout pár drobností jako zbytečně se opakující věty např. v kapitole 4.3.3.3 a 4.3.3.4. Textová tabulková a grafická část je vyvážená, vše je řádně očíslováno a pro přehlednost doplněno legendou s vysvětlením použitých symbolů. U obrázků je vždy odkaz na zdroj.

Dle výsledků lze sumárně disertační práci charakterizovat jako soubor tří částí. Každá část je tvořena stručným úvodem do problematiky, experimentální kapitolou následovanou dílčími výsledky a shrnutím. V první sekci se autorka zabývá vlivem kultivačních podmínek na formaci biofilmu u vybraných stafylokokových kmenů a optimalizací metod vedoucí k hodnocení citlivosti biofilm-tvořících stafylokoků vůči kandidátním potenciálním antimikrobiálním látkám. V této části autorka modifikovala matrice a substráty vhodné pro screeningové studie v in vitro biofilmovém modelu mikrotitračních destiček v režimu třepaných a sesilných kultur a následně vizualizovala tyto struktury pomocí epifluorescenční mikroskopie. V druhé sekci autorka detailně popisuje vlastnosti a vliv nově syntetizované molekuly na bázi chlorovaného derivátu aminooxazolu s cílem jeho využití jako samostatného antinfektiva nebo jako adjuvantní látky při kombinované terapii. Autorka velmi detailně popisuje antimikrobiální působení látky na široké spektrum vybraných bakteriálních a houbových kmenů, aktivitu látky v cílové oblasti biosyntetických drah, depolarizace buněčné membrány, cytotoxicity a současně i její interakce s komerčně dostupnými ATB. Vedle toho autorka charakterizuje tuto látku jako potenciální adjuvant pro zvýšení efektivity komerčně dostupných antibiotik při kombinované terapii. Vedle chemicky syntetizované látky, autorka za využití stejných technik jako v předešlé části testovala antimikrobiální účinky vybraných přírodních látek rostlinného původu, a to derivátů montaninového typu, které mají v současné době široké spektrum využití jako adjuvantní látky v kombinované terapii.

Cíle disertační práce jsou jasně definovány a po prostudování celé předložené práce mohu konstatovat, že byly rovněž splněny. Hlavní dosažené cíle zahrnují optimalizaci a standardizaci tvorby stafylokokových biofilmu v in vitro uzavřeném biofilmovém modelu. Charakterizace vlastností a účinku kandidátních chemických a přírodních látek jako antimikrobiálních látek, která mohou být uplatněna samostatně či v kombinaci s komerčně dostupnými ATB při terapiích proti multirezistentním mikroorganismům širokého spektra druhů a případně uplatněna i při vývoji nových molekul jako antimikrobiálních látek.

K práci mám následující dotazy:

1. Charakterizovala jste v rámci in vitro růstových studií u třepaných kultur jednotlivé fáze růstu, tak abyste mohla v následujících experimentech používat definované kultury? Testovala jste u vybraných bakteriálních kmenů korelaci mezi optickou denzitou a stanovením počtu životaschopných buněk (CFU)?
2. Vlastnosti buněčných povrchových struktur, a s tím související adheze buněk může být ovlivněna vnějšími podmínkami jako jsou měnící se fyzikální parametry, například pH. To může mít i značný vliv na hydrofobní vlastnosti povrchu buněk. Sledovali jste např. změnu pH na vývoj adheze a následné maturace biofilmu na nosiči?
3. Testovala jste navrženou růstovou studii i pro další typy bakterií ESKAPE, které pak využíváte při testování antimikrobiálních látek? Skupina ESKAPE nese několik

- bakterií, které budou reagovat růstově a metabolicky zcela odlišně, což bude hrát důležitou roli ve struktuře biofilmu a následné aplikaci antimikrobiálních látek.
4. V rámci tvorby biofilmu dochází k heterogenitě buněk, které se vyznačují rozdílnou růstovou rychlostí což následně ovlivňuje i jejich citlivost k antimikrobiálním látkám. Sledovali jste rozdíl metabolické aktivity v závislosti na stáří buněk biofilmu při podání antimikrobiální látky?
  5. V případě houbových kultur jste antifungální aktivitu kandidátních látek testovala na na plně vyvinuté hyfální struktuře nebo jste zkoušeli i vliv na germinaci?
  6. Za jakým účelem byla použita izoforma nikotinamidu jako součást struktury molekuly AB15? Hraje tato forma nějakou roli v buňce?

Celkově pokládám předloženou Disertační práci Mgr. Adély Diepoltové vypracovanou na téma „Charakterizace antibakteriálního potenciálu nově syntetizovaných látek a bakteriálních společenství“ za práci velmi kvalitní, která zcela splňuje požadavky kladené na tento typ prací podle § 47 odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, a dále dle příslušného Studijního a zkušebního řádu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové ji doporučuji přijmout k obhajobě.

V Praze, dne 5. června 2024

RNDr. Andrea Palyzová, PhD