

Oponentský posudek diplomové práce

Název: Antibakteriální a cytotoxické účinky přírodních sloučenin

Autor: Bc. Nikola Kohoutová

Bc. Nikola Kohoutová se v diplomové práci zabývala ověřením antibakteriálních účinků vybraných přírodních látek, antibiotik, kyseliny ethylendiamintetraoctové a jejich vzájemných dvojkombinací mikrodiluční metodou. Toxicita testovaných sloučenin byla ověřována na kančích spermích.

Vzhledem ke stále narůstající rezistenci mikroorganismů na používaná antibiotika, je problematika, na kterou je předložená diplomová práce zaměřená, velmi aktuální. Diplomová práce také řeší potenciální využití přírodních látek k dekontaminaci inseminačních dávek používaných k umělé inseminaci prasnic.

Diplomová práce je členěna do obvyklých celků doplněných obrázky, tabulkami a grafy. Text bohužel obsahuje řadu nepřesností a chyb, které snižují kvalitu diplomové práce po obsahové stránce.

K diplomové práci mám následující připomínky:

- V kapitole Význam studia přírodních látek na straně 13 diplomantka uvádí, že u látek přírodního původu nebyl popsán vznik rezistence. Na straně 19 však píše, že některé kmeny pseudomonád jednu z testovaných látek – thymol – mohou degradovat. Předchozí tvrzení tedy není přesné.
- V kapitole 4 „Mechanismus antimikrobiálního působení“ na str. 15 by bylo vhodné popsat stavbu buněčné stěny bakterií na začátku a ne až na konci kapitoly.
- Ve stejné kapitole na straně 16 je nesprávně uvedeno, že základním polysacharidem vnější membrány Gramnegativních bakterií je lipid A.
- V kapitole 5.1 Thymol na straně 17 diplomantka jednou překládá *Origanum* jako dobromysl a jindy používá termín oregano. Na území ČR se vyskytuje *Origanum vulgare* – Dobromysl obecná. Pokud ostatní zástupci tohoto rodu nemají oficiální české označení, doporučila bych používat pouze latinské názvy. Totéž platí pro stranu 20.
- V kapitole 5.1 Thymol na straně 18 autorka nesprávně uvádí jako rozpouštědlo thymolu acetonitril. Databáze Pubchem, kterou diplomantka cituje, udává rozpustnost 1 g thymolu v 1 ml alkoholu.
- V kapitole 5.3 Eugenol na straně 21 diplomatka překládá *Syzygium aromaticum* jako hřebíček. Správně se jedná o strom hřebíčkovec kořenný. Připomínky obdobného charakteru se týkají překladů *Ocimum basilicum* i *Pimenta racemosa*.

- V kapitole 5.3 Eugenol na straně 22 diplomantka uvádí, že Burtová (2004) zjistila minimální inhibiční koncentraci eugenolu pro *E. coli* a *Salmonella* Typhimurium. Zmíněná publikace je review, Burtová zde shrnuje údaje získané jinými autory. Další poznámkou stran použití této publikace je skutečnost, že diplomantka udělala chybu při převodu hodnot uvedených v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a v diplomové práci tak uvádí čísla o 3 řády vyšší. A to na všech místech, kde je publikace citována, včetně diskuse.
- V kapitole 5.9 Ampicilin na straně 32 diplomantka zbytečně zavádí zkratku PBP (penicilin-binding protein) nebo AMP (ampicilin), které nejsou v dalším textu použity. Naproti tomu zkratky pro rodové označení bakterií, obsažené i v seznamu zkratek se používají střídavě s plnými názvy až od strany 33.
- V kapitole 5.9 Ampicilin a 10 Gentamicin diplomantka cituje údaje o minimálních inhibičních koncentracích z publikace Andrewsové (2001). Tato publikace není původní studií, ale zabývá se návrhem metody testování citlivosti, včetně navržených hraničních hodnot pro referenční kmeny, se kterými diplomantka diskutuje.
- Kapitola 5.9 Ampicilin a 5.10 Gentamicin by měla být podpořena větším množstvím původních, a zejména co nejaktuálnějších studií.
- V kapitole Metody stanovení celkového počtu mikrobů studentka používá vzorec a metodologii stanovení převzatou z diplomové práce Hamerského (2009). Informace však pochází z normy ČSN ISO 7218 (2007), jak Hamerský správně uvádí.
- V kapitole 8.1.1 Agarová difuzní metoda na straně 42 je uvedeno, že poloměr inhibičních zón se porovnává s hraničními hodnotami v tabulkách. Správně se jedná o průměr inhibiční zóny. **Mohla by studentka doplnit, s jakými tabulkami konkrétně by hodnoty porovnávala?**
- V kapitole 8.1.2 Disková difuzní metoda na straně 43 by bylo vhodné čerpat přímo z doporučených postupů European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, které jsou pravidelně aktualizovány (poslední aktualizace leden 2015) a byly převzaty jako standard pro ČR.
- V kapitole 8.2.3 Bujonová diluční metoda a mikrodiluční metoda by analogicky doporučila vycházet z platné normy ČSN EN ISO 20776-1 z roku 2007.
- U referenčních kmenů *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 4223 by bylo vhodnější uvádět označení ATCC, které je běžné v zahraničních publikacích. Umožnilo by to lepší srovnání získaných výsledků. Příslušné ATCC daného kmene je uvedeno na internetových stránkách České sbírky mikroorganismů v Brně.

- V kapitole 12.1 Antimikrobiální aktivita jednotlivých látek diplomantka diskutuje zjištěné minimální inhibiční koncentrace ampicilinu a gentamicinu s publikací Andrewsové (2004). Jak již bylo uvedeno výše, nejedná se o původní studii, ale o návrh metody testování. Navíc diplomantka pracovala s inokulem o výsledné koncentraci 10^4 cfu.ml⁻¹ a v publikaci je uváděno inokulum o koncentraci 10^5 cfu.ml⁻¹. Data tedy nelze srovnávat, protože koncentrace inokula je pro testování citlivosti zcela zásadní. Jedinou další diskutovanou publikací je učebnice lékařské mikrobiologie od Bednáře a kol. (1996), což považuji za naprosto nedostačující.
- Ve stejné kapitole na straně 60 diplomantka uvádí, že „nejnižší koncentrace pro všechny bakteriální kmeny byly pozorovány u thymolu a karvakrolu v množství 150-600 mg.l⁻¹“. Při porovnání s tabulkou 6-a (strana 59) je zřejmé, že oba kmeny *Klebsiella* spp. byly citlivé na karvakrol až v koncentraci 2400 mg.l⁻¹. Naopak ze stejné tabulky vyplývá, že velmi dobrých výsledků u většiny testovaných kmenů bylo dosaženo u oktylgallátu.
- Získané výsledky uvedené v kapitole 12.1 považuji za nedostatečně diskutované nejen, co se týče počtu a stáří jednotlivých publikací. U jednotlivých autorů chybí informace o látkách použitých pro rozpouštění sloučenin, ale také o samotné metodice testování, což jsou faktory, které mohou ovlivnit získané výsledky. Toto vhodně dokumentuje např. publikace Mazurové a kol. (2007).
- Z tabulky č. 7 Nejnižší účinné koncentrace kombinací přírodních sloučenin vyplývá, že velice dobrou účinnost má na kmeny *Pseudomonas aeruginosa* také kombinace knicinu a kyseliny gallové, což diplomantka neuvádí.
- **Mohla by studentka vysvětlit, proč nejsou ve výsledcích uvedeny FIC indexy pro kombinace přírodních látek s EDTA a proč nebyla zjišťována účinnost kombinací přírodních sloučenin na kmeny *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*?**
- Kapitola 12.3 Celkové počty mikroorganismů na straně 67 obsahuje informace o provedení této metody, které jsou rovněž součástí Experimentální části diplomové práce. Jedná se o zbytečné opakování již napsaného.
- Bylo by přehlednější, aby grafy 1-8 dokumentující motilitu spermií v přítomnosti různých koncentrací testovaných látek obsahovaly také data o pohyblivosti spermií v kontrole bez inhibitorů.
- Některé položky v Seznamu použité literatury neodpovídají ČSN ISO 690 Informace a dokumentace – Pravidla pro bibliografické odkazy a citace informačních zdrojů, zejména se jedná o citace elektronických zdrojů.

- Doporučila bych omezit citování elektronických zdrojů, konkrétně databáze Pubchem je citována velmi často i tam, kde je možné použít citaci originální publikace, na kterou Pubchem odkazuje.
- Diplomantce bych také doporučila používání co nejaktuálnějších zdrojů informací. Ze seznamu literatury vyplývá, že více jak polovina zdrojů je starších 10 let.

I přes uvedené připomínky splňuje diplomová práce Bc. Nikoly Kohoutové své zadání, zejména je potřeba ocenit značné množství manuální práce při zpracování tak velkého množství vzorků. Diplomovou práci **doporučuji** k obhajobě a hodnotím známkou **dobře**.

V Pardubicích 23. 5. 2015



RNDr. Petra Mosio, Ph.D.