

## **Oponentský posudek disertační práce Mgr. Rudolfa Kukly na téma „Metody monitorující antimikrobiální účinky přírodních látek“.**

Předložená disertační práce obsahuje 125 stran textu včetně seznamu zkratk, literárních odkazů, a webových odkazů k obrázkům.

Práce se věnuje zkoumání účinků dvanácti látek rostlinného původu na vybrané bakterie, které se nejčastěji podílejí na bakteriální kontaminaci kančího spermatu. Téma práce je vysoce aktuální. Momentálně žijeme v období, o kterém se již několik let zcela nepokrytě hovoří jako o období antibiotické krize. Antibiotika jsou v pozadí obrovských úspěchů téměř všech medicínských oborů a moderní medicínu si bez nich už nedovedeme představit. Bohužel, v poslední době ztrácejí účinnost šířením rezistentních bakteriálních kmenů. Příčinou je nadměrná spotřeba antibiotik nejenom v humánní a veterinární medicíně, ale i v dalších lidských činnostech, jako je například zemědělství. Vývoj nových antibiotik sice probíhá, do klinické praxe se jich ale dostává velmi málo. V této situaci je každé omezení používání antibiotik vítané. Pozornost se v posledních letech věnuje řadě látek rostlinného původu od česneku po exotické tropické rostliny. Většinou se jedná o sekundární metabolity. Chemickým složením se jedná o velmi různorodé látky od polypeptidů až po různé silice a oleje. Využitím těchto látek a jejich antimikrobiálními účinky se v posledních letech zabývá řada prací. Praktických použitelných výstupů bylo ale popsáno relativně velmi málo.

Práce je postavena velmi promyšleně z hlediska proveditelnosti a pravděpodobnosti získání pozitivních výsledků. Využívá ověřených metodik testování citlivostí bakteriálních kmenů metodami MIC a MBC. Po této stránce nepřináší nic nového, účinky testovaných látek na různé bakteriální kmeny již byly popsány. Novum je myšlenka praktického využití pro ošetření kančího spermatu. Byly cíleně vybrány a testovány bakterie, které se nejčastěji podílejí na jeho kontaminaci. Jako přídatek byla ještě provedena u vybraných látek spermio-toxicita. To považuji za velmi významné, protože se tím výsledky práce posunuly k praktickému využití.

Předložená dizertační práce dokladuje zvládnutí složitých metodik testování účinků látek rostlinného původu. Tyto metodiky principiálně vycházejí z běžně používaných metodik pro testování antibiotik. Z vlastních zkušeností ale mohu potvrdit, že jejich aplikace na látky rostlinného původu naráží na řadu komplikací, které musely být vyřešeny. Vzhledem k počtu testovaných látek a bakteriálních kmenů bylo do získání laboratorních výsledků vloženo

nesrovnatelně větší množství práce v porovnání s řadou disertačních prací, které jsem měl tu čest oponovat.

Cíle práce byly stanoveny zcela jasně s logickým, na sebe navazujícím postupem. Postup řešení vytyčených problémů je metodický a přesný. Použité metody jsou odpovídající pro získání adekvátních výsledků ve všech stanovených cílech – zavedení metod pro průkaz mikroorganismů v biologickém materiálu, stanovení antimikrobiálních účinků testovaných látek včetně jejich kombinací, zjištění jejich toxicity a analýza výsledků. Všechny cíle stanovené v zadání práce byly splněny.

Získané výsledky jsou přesně, metodicky popsány, představují často prioritní data a hlavně mají velký potenciál pro praktické využití. V rozsáhlé diskuzi autor prokázal, že se dokonale orientuje v dané problematice a je schopen správně posoudit získané výsledky. Práce svědčí to o tom, že autor je schopen samostatné vědecké činnosti a aktivního řešení problémů.

### **Formální stránka**

Členění práce odpovídá standardnímu členění vědeckých prací. Názvy jednotlivých kapitol jsou jednoznačné a logické. Autor věnoval formální stránce opravdu velkou pozornost, nenašel jsem téměř žádné chyby ani překlepy. Jazyková stránka práce je na vysoké úrovni. Práce s literaturou je rovněž na vysoké úrovni, všechna zásadní tvrzení jsou doložena více než 190 recentními odkazy na národní i mezinárodní literaturu. Po formální stránce jsou odkazy rovněž bezchybné.

Jedinou výtku bych měl k tomu, že se autor do detailů zabývá problematikou stanovení antimikrobiálního účinku testovaných látek a získaných výsledků. Zcela správně je diskutuje a srovnává s výsledky jiných autorů. V této záplavě informací se ale poněkud ztrácí to nejdůležitější – které látky a v jakých koncentracích se mohou použít pro ošetření kančího spermatu. Zasloužilo by si to přehlednou tabulku.

Je třeba ocenit, že Mgr. Rudolf Kukla je autorem či spoluautorem odborných prací v recenzovaných časopisech, z toho 4x v časopisech s impact faktorem (1x první autor ve velmi prestižním časopisu Antimicrobial Agents and Chemotherapy). Předloženou disertační práci **doporučuji** k obhajobě a předkladateli by měl být na základě úspěšné obhajoby udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle §47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

**K předkladateli práce mám tři dotazy:**

1. Ve výsledcích se používají termíny MIC<sub>50</sub> a MBC<sub>50</sub>, jsou rovněž uvedeny v seznamu zkratk. Zde a v textu pod tabulkami je pouze uvedeno, že se jedná od minimální bakteriostatickou/baktericidní koncentraci pro 50% bakteriálních buněk. Můžete, prosím vysvětlit, jakou metodikou jste tyto výsledky získal?
2. Co jsou sekundární metabolity a jaký mají význam pro rostlinu?
3. Řada sekundárních metabolitů je nestabilních a postupně dochází k jejich transformaci a změně účinků. Například xanthohumol, látka se silnými antimikrobiálními účinky se postupně mění na 6 a 8prenylnaringenin, což jsou nejsilnější fytoestrogeny. Látky s hormonální aktivitou byly prokázány například v jetelu nebo ve chmelu. Rostliny se tímto způsobem chrání proti požití hmyzími housenkami, u kterých poté neproběhne proměna v dospělé hmyz. Do jaké míry jsou Vámi testované látky stabilní (hlavně ty co by byly prakticky použitelné - karvakrol, thymol) zejména ve vodném roztoku. Jsou tyto údaje známy?

V Praze dne 1. 2. 2018

Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.

## Oponentský posudek

Předkládám oponentský posudek disertační práce s názvem „Metody monitorující antimikrobiální účinky přírodních látek“, kterou předložil Mgr. Rudolf Kukla. Disertační práce s celkovým počtem 125 stran je členěna do kapitol obvyklých pro tento druh spisu. S uspokojením musím konstatovat, že grafická úprava a textové zpracování dosahují vysoké úrovně, která svědčí o pečlivém a odpovědném zpracování práce, které není dne vždy samozřejmostí.

Téma práce je velmi aktuální, protože řeší alternativní možnosti využití antimikrobiálních látek přírodního původu v době, kdy je zřejmé, že velké objemy AML charakteru antibiotik, nebo chemoterapeutik, vedly ke vzniku a rozšíření získané rezistence významných bakteriálních původců onemocnění člověka a zvířat. Práce se tedy svým obsahem odpovídá moderním trendům výzkumu zaměřeným na náhradu AML tam, kde to je možné s cílem snížit jejich spotřebu ale i riziko dalšího šíření klonů bakterií se získanou rezistencí. Jednou z takových významných nik je i rutinní používání antibiotik v různých kombinacích za účelem udržení kvality inseminačních dávek kanců, které se děje v globálním měřítku. V této práci oceňuji zejména skutečnost, že testované přírodní látky byly velmi početné a že zahrnovaly různé skupiny substancí a jejich zdrojových rostlin. Kromě základní studie byly vyšetřovány také účinky kombinací vybraných látek, což považuji za velmi složitý postup, který poskytl výsledky pro mne nejdůležitější. Mohu konstatovat, že komplexnost záběru této práce je výsledkem systematického přístupu ale i dlouhodobé výzkumné spolupráce několika týmů z různých univerzitních a výzkumných pracovišť u nás.

Cíle předkládané práce jsou stanoveny logicky s jasnou formulací. Kromě metodologické stránky zaměřené na standardizaci testování *in vitro* se jednalo o další náročné cíle, zejména s ohledem na charakter a minimální množství použitých přírodních látek. Jako mimořádný cíl pro ověření možné toxicity testovaných látek bylo zvoleno sledování účinků ve vzorcích kančího spermatu. Jde bez pochyby o vhodný, dostupný a velmi citlivým model. Tímto modelem se však práce posouvá do oblasti aplikovaného výzkumu, kde se očekávají další výstupy a aplikace poznatků v budoucnu.

V teoretické části disertační jsou zpracovány nejprve základní literární údaje související s použitými metodami stanovení antimikrobiálních aktivit přírodních látek. Hlavní pozornost je však věnována publikacím, které charakterizují látky testované v této práci rozdělené do kapitol látky přírodní a silice. Mohu konstatovat, že použité literární zdroje jsou recentní a jejich zpracování v případě každé látky je komplexní a detailní, přičemž je zachována srozumitelnost obsahu, což je významné pro pochopení smyslu zařazení dané látky do studie. Každá z těchto látek je popisována podle stabilní osnovy, což umožňuje snadnou orientaci v předkládaných poznatcích, včetně jejich srovnání.

Kapitola Materiál a metody je zpracována přehledně s použitím tabulek v případě materiálu. Použité metody jsou popsány tak, že umožní reprodukci i v jiné laboratoři. Má připomínka se týká nativních vzorků ejakulátu kanců použitých při stanoveních spermio toxicity. Byla v nich sledována úroveň bakteriální kontaminace během testu, na počátku a později po 72 h?

Výsledky. První tabulka (č. 3) prezentuje kultivovatelné mikroorganismy izolované z 30 vzorků kančích ejakulátů. Z textu není zřejmé, zda se jednalo o opakované odběry několika dárců (kanců), nebo každý z vyšetřených vzorků reprezentoval jiného kance? Jak lze vysvětlit, že 5 vzorků z celkového počtu 17, ze kterých se izoloval druh *P. aeruginosa*, obsahovalo vysoké počty CFU na 1 ml? Pocházeli kanci ze stejné stanice (chovného zařízení), nebo z několika různých? Poněkud nelogicky vzhledem k sekvenci použité v prvních dvou kapitolách se jako první v kapitole výsledky prezentují MIC silic a pak teprve MIC dosažené pro celou skupinu přírodních látek pro bakteriální kmeny různého původu, což je podle mne jádro výsledků práce. Měl disertant nějaký důvod k takové sekvenci prezentace výsledků? Výsledky dosažené při testování přírodních látek jsou uspořádány přehledně v čtených tabulkách, což hodnotím velmi pozitivně. Získané hodnoty jsou velmi zajímavé jak s ohledem na testované široké spektrum látek i početné zastoupení mikroorganismů různého původu. V textové části jsou výsledky interpretovány výstižně, tak že jasně shrnují potenciál jednotlivých látek pro jednotlivé skupiny bakterií (gram pozitivní a gram negativní) ale i některé jejich druhy. Výsledky testování jednotlivých látek tak poskytly výborný základ pro další fázi studie. Tou jsou výsledky testování účinků vybraných kombinací přírodních látek a EDETA. Za velmi cenný považují zejména prokázaný synergický účinek některých látek pro kmeny *P. aeruginosa* a *Enterococcus faecalis*, protože tyto dva druhy jsou skutečným problémem z hlediska jejich citlivosti ke klasickým antibiotikům přidávaným například do dávek kančího spermatu. Velmi zajímavé jsou také výsledky hodnocení některých kombinací s aditivním účinkem. Graficky názorně jsou rovněž prezentovány výsledky testování spermio toxicity přírodních látek na základě hodnocení motility kančích spermií. K této části výsledků mám několik dotazů. Jak si disertant vysvětluje nulovou motilitu v případě testování thymolu a karvakolu v koncentraci 600 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), když dávky 300 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), byly ještě s přijatelným dopadem na motilitu? Druhý dotaz se týká výsledků testování methyl-gallátu a etyl-gallátu u nichž nižší koncentrace (300 a 600  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), vykazují od 1 h inkubace dokonce pozitivní vliv, tedy zvýšení motility spermií. Je nízká motilita v čase 0 u těchto látek výsledkem spermio toxicity, nebo není? Ve všech ostatních případech (s výjimkou propyl-gallátu) je pohyblivost spermií v čase 0 na úrovni negativní kontroly a následně dochází k logickému poklesu rychlému nebo pomalému.

Kapitola diskuze je zpracována obsáhle s použitím velkého množství odkazů, na jejichž podkladě srovnává každou část získaných výsledků testování jednotlivých látek a jejich kombinací. Ve většině případů konstatuje shodu, nebo podobnost dosažených výsledků, přičemž racionálně zdůvodňuje možné příčiny odchylek. Velmi pozitivně hodnotím, že disertant prezentuje vlastní

názory na podkladě dosažených výsledků práce ale i studia literatury, přičemž zachovává potřebný odstup a skromnost. Z této kapitoly bych vyzvedl, jako mimořádně zdařilé vedení diskuze týkající se účinků jednotlivých kombinací látek, která je vyvážená a zajímavá pro čtenáře. Tuto část však obsahem překonává poslední subkapitola, která sumarizuje dosažené výsledky v tabulce č. 9. Obsah této tabulky názorně dokumentuje perspektivy možnosti využití přírodních látek a jejich kombinací pro účely dekontaminace kančích ejakulátů. Navrhovaná řešení jsou opět racionálně zdůvodněna v textu.

Závěry práce jsou formulovány stručně pro jednotlivé cíle. Autor zřetelně vyzdvihuje hlavní poznatky práce, které se týkají synergického, nebo aditivního účinku testovaných dvojkombinací karvakolu s thymolem, nebo dvojkombinací těchto jednotlivých látek s EDTA, které současně prokázal jako méně toxické s předpokladem pro jejich použití při dekontaminaci inseminačních dávek kanců.

Mohu konstatovat, že vytčené cíle práce byly nejenom splněny ale i překročeny. Jedná se o vysoce kvalitní práci, která je ojedinělá u nás. Přináší velmi cenné výsledky, které významnou měrou rozšiřují naše poznání o nové poznatky týkající se antimikrobiálních účinků přírodních látek a jejich spermiotoxicity pro spermie kanců.

Na otázku zda student prokázal tvůrčí schopnosti, odpovídám jednoznačně ano. V souladu s § 47 VŠ zákona 111/98 Sb. prohlašuji, že disertační práce předložená Mgr. Rudolfem Kuklou splňuje požadavky kladené na disertační práce v oboru a proto ji doporučuji přijmout jako podklad k udělení vědecké hodnosti Ph.D.

Zpracoval:

V Brně dne 21. ledna 2018

Prof. MVDr. Jiří Smola, CSc.,

Přednosta kliniky chorob přežvýkavců a prasat

FVL VFU Brno

