

<b>Posudek oponenta na diplomovou práci</b>	
X oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Jiří Mašín, PhD.
	Datum: 25.8. 2020
Autor: Michaela Helusová	
Název práce: Mechanismus antibakteriálního účinku 4. generace lipofosfonoxinů	
<b>Cíle práce</b> Cílem této diplomové práce bylo zjistit mechanismus účinku 4. generace LPPO a studovat vliv struktury LPPO na jejich aktivitu.	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO</b> Rozsah práce (počet stran): 95 stran Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? 9 Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? Ano	
<b>Diskuze:</b> Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	
<b>Závěry (Souhrn) :</b> Jsou výstižné? ANO	
<b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Formální úroveň práce je na velmi dobré úrovni. Text obsahuje pouze minimum překlepů. Autorka se v některých případech nevyhnula používání tzv. laboratorní hantýrky (např. supernatant byl slit, pelet byl stočen).	
<b>Splnění cílů práce a celkové hodnocení:</b> Cíle práce byly splněny. Celkově práci hodnotím jako velmi zdařilou.	
<b>Otázky a připomínky oponenta:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Píšete, že jako pozitivní kontroly při měření membránového potenciálu případně permeabilizaci membrány účinkem LPPO byl použit polymyxin B, případně melitin. Proč nejsou v diplomové práci ukázána data s těmito kontrolami?</li> <li>2) Bylo v pokusech ohledně permeabilizace buněk PI, při měření sondou NPN, případně při měření membránového potenciálu odečítáno pozadí samotných buněk (nulová koncentrace LPPO)? V některých experimentech se dá jako negativní kontrola brát</li> </ol>	

látka 7107. Ale například u obr. 5.10C (permeabilizace pomocí PI) tvrdíte: **látka 7107 měla oproti zbylým dvěma LPPO velmi slabou pórtvornou aktivitu, a to dokonce bez ohledu na použitou koncentraci.** Není to tedy tak, že stejná křivka (zvýšení IF PI) by se v tomto případě změnila i po inkubaci samotných buněk *S. aureus* po přidavku vody (jako rozpouštědla) místo látky 7107?

- 3) Na str. 69 tvrdíte, že již po první minutě působení LPPO 7072 došlo k propadu CFA téměř na nulu. Dá se u experimentů, kde stanovujete vliv LPPO 7072 na životaschopnost bakterií a počítáte až kolonie vyrostlé na miskách mluvit skutečně o konkrétní době působení LPPO v řádu jednotek minut? Pokud po odběru v daném čase neproběhlo odstranění nenavázaného LPPO (např. centrifugací), chvíli trvá ředění, vlastní vyšetření na plotny-takže již tady bych byl opatrný mluvit o konkrétní době působení LPPO. Můžete navíc vyloučit, že dosud nenavázaný LPPO nemůže interagovat s buňkou až po vyšetření na kultivační půdu? Nedávaly by při stejném uspořádání experimentu smysl spíše koncentrační závislosti LPPO versus CFU/CFA?
- 4) Vzhledem k tomu, že prakticky okamžitě klesly hodnoty CFA u *S. aureus* i *E. coli* téměř na nulu (obrázek 5.15 a 5.16), nebylo třeba pro porovnání baktericidního účinku na G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterie zvolit nižší koncentraci LPPO 7072 než 10 µg/ml?
- 5) Dá se z pouhého měření změn IF při měření změn membránového potenciálu sondou DiSC3(5) (tj. bez kalibrace např. valinomycinem pro danou G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterii) říci: **Všechny tři látky vykazovaly větší depolarizační účinek proti bakteriím *S. aureus*** (jak tvrdíte na str. 67) v porovnání s *E. coli*?
- 6) V kapitole 5.4. (str. 68) u měření desintegrace vnější membrány *E. coli* sondou NPN píšete: **Největší míru depolarizace způsobil LPPO 7070.** Měří tedy sonda NPN desintegraci či depolarizaci membrány?
- 7) Proč byl vliv LPS na kinetiku lyze liposomů studován u kombinace lipidů PG:PE, tj. na systému mimikujícím membránu G<sup>+</sup> bakterií?
- 8) Na straně 82 píšete: **Ve shodě s těmito závěry jsou i výsledky pokusů na lipozómech, které obsahovaly ve svých membránách LPS.** Je známo z literatury, že pouhá preinkubace liposomů a LPS způsobí navázání LPS do membrány liposomů?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

X výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: