

Oponentský posudek na bakalářskou práci Evy Černotíkové „Možnosti využití HPMA v terapii mikrosporidíózy“

Cílem této práce bylo posoudit potencionální možnost využití HPMPA k eliminaci mikrosporidiové infekce za současného použití probenecidu snižujícího nefrotoxicitu výše uvedené látky. Pokusy byly prováděny na modelech *in vitro* i *in vivo*.

Práce je členěna do následujících oddílů:

V rámci literárního úvodu autorka čtenáře nejprve seznamuje s biologií mikrosporidií, dále pak popisuje použití acyklických nukleofosfátů, mezi než patří i HPMA, k léčbě virových a parazitárních onemocnění (str. 5 - 11).

Práce pokračuje popisem použitých metod (str. 13 - 19), na které navazuje kapitola výsledky (str. 20 - 26), diskuse a závěry (27 - 31).

Na str. 32 - 37 je uveden seznam citované literatury. Práce je doplněna fotografickou dokumentací na str. 37 - 40.

K práci mám připomínky týkající se zejména použitých metod a interpretace výsledků. Žádám autorku, aby reagovala pouze na tučně zvýrazněné dotazy.

- V názvu práce by měl být použit celý název testovaného preparátu v nezkrácené podobě.
- Autorka neuvádí množství použitých ATB a ATM v kultivačním médiu, ani teplotu pro kultivaci mikrosporidií a pro experimentální pokusy *in vitro* (str. 13, 14).
- **Byly spory do pokusů přečištěny? Pokud ano, tak jak, pokud ne, jak byly spory počítány?**
- Není uvedeno typové označení SCID myši ani dodavatel (str. 14).
- **V jakém rozsahu byly buňky infikovány před vlastním experimentem *in vitro*?** Nebylo by lepší nasadit do panelu neinfikované buňky, přidat k nim přesné množství spor a následně se pokusit o jejich přelčení? (str. 14)
- **Z jakého důvodu byla pro infekci SCID myši použita dle mého názoru značně vysoká infekční dávka 7×10^8 spor?** (str. 14)
- Domnívám se, že kontrolní infikované neléčené skupině mělo být podáváno alespoň placebo, lépe by odfiltrovalo vliv případného stresu popřípadě poranění sliznic, zvláště při opakovaném každodenním podávání preparátu (str. 15).
- Z metodiky není zjevné, v jakých časových intervalech byly vzorky tkání histologicky zpracovány. Pravděpodobně po úhynu zvířat nebo těsně před tím. Přesnější výsledky by dle mého názoru přinesl pokus, při kterém by byly léčené myši postupně systematicky odebírány k histologickému zpracování v průběhu celého pokusu (str. 15).
- **Pokusila jste se statisticky vyhodnotit přežívání myší? Pokud ano, jakým testem?**
- **Byl nějakým způsobem vyhodnocen vliv HPMA a probenecidu na neinfikované buňky?**
- Z popisu výsledků testování vlivu probenecidu *in vitro* ani z uvedeného grafu a tabulky není jasné, která z testovaných koncentrací byla použita.
- Graf 2. Nerozumím informaci ohledně množství vylučovaných spor v rozsahu hodnot 1 – 6 respektive 1 až více než 50. Lepší by bylo tyto hodnoty nějak standardizovat jako např. množství vylučovaných spor na gram trusu.
- Graf 3. Autorka uvádí, že první úhyny byly zaznamenány 28 DPI. Z grafu je však možné odečíst první úhyn až 30. den po infekci. **Kde je chyba?**
- **Proč nebyla do grafu 4 (infekce peritoneálních makrofágů) zapracována všechna pokusná zvířata?** Výpovědní hodnota tohoto výsledku by byla mnohem vyšší.
- V prvním odstavci na straně 29 autorka v souvislosti s mikrosporidiovou infekcí píše nesprávně o parazitemii.
- O větu níže autorka uvádí, že jedním z možných vysvětlení přežívání dvou pokusných myší by mohl být výskyt tzv. „leaků“. S tímto vysvětlením nesouhlasím. Se SCID myšmi pracuji již poměrně dlouhou dobu, ale výskyt spontánní mutace obnovující funkční imunitní systém těchto myší jsem nezaznamenal. Navíc tuto domněnku si pochybní autorka mohla ověřit analýzou na průtokovém cytometru. Já bych přežívání infikovaných pokusných zvířat vysvětloval buď účinností podávaného preparátu nebo neefektivní aplikací infekčního agens.
- V závěru diskuze a v sumarizovaných závěrech autorka píše, že se preparát HPMA nejeví jako vhodná terapie pro mikrosporidíózu z důvodu nepříznivého vlivu na organismus a nedostatečné

účinnosti na mikrosporidiovou infekci. S těmito závěry nemohu souhlasit, jelikož samotný vliv HPMA na neinfikovaná zvířata autorka netestovala. Pokud se jí preparátem podařilo mikrosporidiózu vyvolanou dávkou 7×10^8 spor, která dle mého názoru 70 x překračuje standardní infekční dávku, vyléčit byť jen u dvou jedinců ze šestnácti, pak se mi efekt preparátu jeví naopak slibným.

- Na samém konci diskuse se autorka uchyluje k tezi, že lepší než léčit mikrosporidiózu je léčit přímo HIV infekci. Teorie je to zajímavá, pramálo však bere ohled na pacienty trpící vrozenou imunodeficiencí popřípadě pacienty imunosuprimované z důvodu transplantací či v důsledku protinádorové terapie.
- Vzhledem k tématu práce bych v rámci úvodu či diskuse uvítal zmínku o dalších potenciálně terapeutických látkách, které se proti mikrosporidiím vyvíjejí, např. syntetické analogy polyaminů.

Práci doporučuji k obhajobě, autorka se pravděpodobně v průběhu řešení projektu seznámila s řadou laboratorních metod a sepsáním diplomové práce prokázala schopnost práce s vědeckou literaturou. Zadání práce v tomto rozsahu studentovi bakalářského programu však nepovažuji za šťastné. Rozumnější by dle mého názoru bylo rozdělit tuto práci na dvě samostatné studie (*in vitro* a *in vivo*) a postupně je v bakalářské a magisterské práci mnohem důkladněji zpracovat.

V Českých Budějovicích 22. ledna 2008

RNDr. Jirí Salát, Ph.D.

