

## Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Lindy Matoušové „Testování účinků o-fosfonatomethylcholinu a jeho analogů proti leishmaniím“

Práce se zabývá *in vitro* testováním účinku o-fosfonatomethylcholinu a jeho analogů na promastigoty *Leishmania major* a určením jejich  $IC_{50}$ , tedy koncentrace mající za následek 50 % snížení růstu kultury vzhledem ke kontrole.

Diplomová práce má klasické členění. Úvod je psán velmi přehledně, logicky a na 16 stránkách poskytuje dostatečně široký a úplný náhled do celé problematiky. Metodická část je přehledná a kvalitně zpracovaná. Chybí mi jen udání výrobce Cell Proliferation Kitu II (XTT).

Kapitoly Výsledky a Diskuse kvalitně prezentují získané výsledky, vynikající je výpočet  $IC_{50}$  a rovněž diskuse výsledků je většinou adekvátní. Velice pěkná je kalibrační křivka (Graf 2). Je dobré, že byla takto prokázána lineární závislost mezi počtem promastigotů a aktivitou měřenou fotometricky, i když bych v tomto bodě měl jednu připomínku. Nelze plně vyloučit, že zkoušené látky neovlivňují kromě proliferace i vitalitu promastigoty a třeba i aktivitu dehydrogenáz. Pak by měření absorbance, tedy měření dehydrogenáz, nemuselo odrážet počet promastigotů, ale jen aktivitu jejich mitochondriálních dehydrogenáz, což nemusí být totéž. Bylo by tedy vhodné udělat pokus, kdy se vyzkouší fotometrický signál od promastigotů pod vlivem různých koncentrací některé studované sloučeniny včetně nulové kontroly a zjistí se, zda fotometrický údaj za těchto okolností koreluje opravdu s údajem početním, spočítáním promastigotů. Bylo to zkoušeno?

Dále bych měl výhrady k přechodu od počítání promastigotů k fotometrii. Důvody jsou logické a proti objektivizaci a urychlení nic nemám. Ale nelíbí se mi, že se srovnávají dva pokusy provedené za odlišných podmínek (milimolární versus mikromolární koncentracím). Zbytečnou se mi zdá i kritika velkých směrodatných odchylek u počítání. Já jsem naopak byl grafem 1 naprosto nadšen a o takových matematicky dokonalých výsledcích se mi může jen zdát. Beru deformity u promastigotů i když bych řekl, že modrá je modrá, ale budiž. Ale co když by to u mikromolárních koncentrací vypadalo lépe? Navíc by počítání u takto postaveného pokusu, jehož koncentrační rozsah byl velmi dobře nastaven, poskytlo přesné údaje o proliferaci a možný vliv na aktivitu dehydrogenáz (viz výše) by se neprojevil.

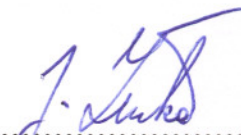
Docela mě mrzelo, že miltefosin nebyl zkoumán paralelně s o-fosfonatomethylcholinem a jeho analogy, když byl k dispozici. Byla by pak jednotnou metodikou stanovena jeho  $IC_{50}$  a mohlo být provedeno zodpovědné srovnání. Vzhledem k tomu, že je diskutována otázka jeho nahrazení něčím levnějším, bylo by exaktní srovnání na místě. Porovnání bylo provedeno jen při jediné koncentraci a ani nebyla uvedena doba kultivace. Z grafu 5, který toto srovnání dokumentuje, vyplývá, že takto není dobré srovnání dělat. Látky H-3519 až H-3504 seřazené podle  $IC_{50}$  vykazaly při této koncentraci prakticky stejnou aktivitu. Miltefosin, který by podle literárních údajů měl být na základě  $IC_{50}$  méně účinný, byl naopak účinnější. Nelze se divit, stanovení jeho parametrů bylo provedeno za jiných podmínek, tudíž pro správné srovnání je třeba se opřít pouze o  $IC_{50}$  stanovených jednou metodou v jedné laboratoři. V práci Escobara et al., 2002 je uvedeno pro  $IC_{50}$  miltefosinu širší rozmezí. Chápal bych to tak, že v tomto širším rozmezí je účinnost srovnatelná, což by se mohlo projevit spíše nižšími směrodatnými odchylkami, než většími, jak se domnívá autorka, mohu se však mylit.

Závěr dobře shrnuje dosažené výsledky. Možná by bylo přehlednější jeho uspořádání v bodech, ale to není tak zásadní.

Kromě jedné výše uvedené otázky a případné reakce na mé kritické poznámky bych se chtěl ještě zeptat na pár drobností. Na str. 14 by mě zajímalo, jak se dělá obarvení parazitů aglutinovaných protilátek ze séra pacienta. Na str. 15 je zmiňováno působení sloučenin

antimonu na glykolýzu a beta-oxidaci mastných kyselin, na str. 18 pak kompetice paromocínu a ATP. Jak je možné vysvětlit, že tyto interference ovlivní přednostně parazity, když u hostitele se vyskytují stejné metabolické dráhy a ATP je zrovna tak důležité.

Závěrem bych chtěl konstatovat, že práce Bc. Matoušové je důležitým příspěvkem v oblasti terapie leishmanií a přináší velmi důležité poznatky. Práce je vypracována velmi precizně a uvedené připomínky nikterak nesnižují její hodnotu a nesporný přínos. V této podobě ji hodnotím stupněm „velmi dobrá“. V případě, že autorka rozmetá mé kritické připomínky, nebudu mít problém s ještě lepším hodnocením.



.....  
RNDr. Jan Ženka, CSc.

V Českých Budějovicích dne 21.5.2010

## „Testování účinků o-fosfonatomethylcholinu a jeho analogů proti leishmaniím“

Bc. Linda Matoušová se ve své práci snaží stanovit na modelu *L. major*  $IC_{50}$  pro o-fosfonatometylcholin a jeho 5 analogů. Z výsledků její práce vyplývá, že některé z těchto sloučenin mají skutečně inhibiční vliv na leishmanie a jsou proto potenciálně využitelné jako léky proti leishmaniózám.

Tak jako prakticky v každé práci obdobného rozsahu, i zde najdeme několik překlepů a chyb (např. „... jsou státa uvolněny“ místo „stádia uvolněna“, str. 9, po kapitole 2.8. následuje v textu kapitola 2.10., a několik dalších). Autorka na některých místech používá termín „miltefosin“ (např. str. 19, 38), jinde „miltefosine“ (např. str. 34, 37). Na str. 18 autorka uvádí, že miltefosin „u leishmanií působí na buňky signálních drah“ – patrně měla na mysli „molekuly signálních drah“.

Kromě výše uvedených drobností mám k předložené práci několik vážnějších výhrad:

1. Úvodní kapitola, která je literární rešerší k danému tématu, tedy především leishmaniózám a jejich terapii, působí poněkud neúplně a je mírně matoucí. V některých podkapitolách jsou opomenuty různé druhy leishmanií resp. typy leishmanióz. Tak se např. v kapitole „2.6.1. Leishmanióza“ nedozvíme nic o *L. donovani* (kromě údaje v tabulce), ostatním „lidským“ druhům je v textu věnována alespoň zmínka. Jinde, v kapitole „2.7.1. Etiologická diagnóza“ zase autorka říká, že „leishmanie mohou být ... kultivovány z aspirátu sleziny, kostní dřeně, lymfatických uzlin a jater.“ Předpokládám, že toto se týká pouze viscerální leishmaniózy, což v textu není uvedeno. Matoucí je také pořadí odstavců v kapitole „2.6.2. Klinické příznaky“, kde by dle mého názoru působilo lépe, kdyby text věnovaný viscerální leishmanióze nebyl přerušen „vsuvkou“ o leishmanióze kožní. Druhu *L. major* je jako jedinému věnována samostatná kapitola (kap. 2.5. „*Leishmania major*“), ovšem vzhledem ke své délce (5,5 řádku) mohla klidně být „rozpuštěna“ v jiných kapitolách. Druhý odstavec kapitoly 2.6.2. je takřka identický s částí kapitoly 2.

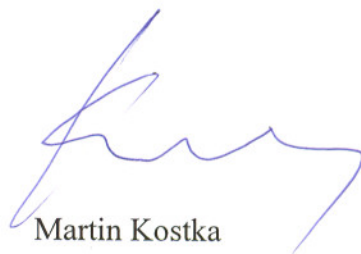
Celkově mám dojem, že uspořádání literárního přehledu není nejšťastnější. V mnoha případech není jasné, zda určité tvrzení platí pro leishmanie obecně nebo jen pro určitý typ leishmaniózy. Vhodnější by bylo patrně věnovat jednotlivým typům leishmaniózy samostatné kapitoly.

2. Úvodní část kapitoly „diskuse“ (asi 1,5 strany), kde se autorka zabývá terapií, jejími náklady a komplikacemi, není pravou diskusí a patří dle mého názoru spíše do literárního úvodu.
3. Autorka použila pro stanovení  $IC_{50}$  dvě různé metody – přímé sledování promastigotů v Bürkerově komůrce a měření metabolické aktivity promastigotů sledováním konverze XTT. Výsledky obou měření se však drasticky liší: pokud srovnáme v grafech 1 a 3 výsledky naměřené po 48 hodinách kultivace pro třeba analog H-3504, zjistíme, že srovnatelný pokles životaschopnosti (tj. zhruba pětinaová životaschopnost oproti kontrole) vykazují leishmanie při koncentraci 2,5 mM (přímé pozorování) resp. 10  $\mu$ M (konverze XTT) – to je rozdíl dvou až tří řádů! V diskusi autorka metodu přímého počítání zavrhuje jakožto zatíženou subjektivitou s tím, že „data mají velké směrodatné odchylky“. Co je dle autorky „velká směrodatná odchylka“? V práci by měly být uvedeny konkrétní hodnoty! Vzhledem k tak výraznému rozdílu mezi oběma metodami by bylo vhodné provést měření s nějakou pozitivní kontrolou. Jakožto o pozitivní kontrole autorka mluví na str. 27 o miltefosinu, uvádí i hodnoty  $IC_{50}$  zjištěné pro něj jinými autory, nikde však neuvádí, jaká

hodnota  $IC_{50}$  pro miltefosin vyplývá z jejích vlastních měření. Podle srovnání s analogy o-fosfonatometylcholinu v grafu 5 a hodnot uvedených v tabulce 4 se lze domnívat (ne však s jistotou tvrdit), že tato hodnota by dle autorčiných výsledků vyšla pro miltefosin méně než  $1,45 \mu\text{M}$ , což nesouhlasí s výsledky dle Escobar et al. 2002, kteří naměřili  $IC_{50}$   $4,8 - 13,1 \mu\text{M}$  (str. 27). Tyto dvě skutečnosti – rozdílné výsledky měřené rozdílnými metodami a potenciální nesoulad s výsledky jiných autorů – vrhají stín pochybností na hodnoty naměřené autorkou. V práci měla být uvedena hodnota  $IC_{50}$  pro miltefosin naměřená autorkou a výše uvedené skutečnosti měly být podrobněji diskutovány.

Práci **doporučuji k obhajobě** a vzhledem k výše uvedeným skutečnostem ji s jistou opatrností navrhuji hodnotit jako „velmi dobrou“, pokud autorka uspokojivě zodpoví následující otázky:

1. Na straně 26 autorka píše, že dle Williams et al. 2003 odpovídají výsledky získané sledováním konverze XTT těm, které byly získány „jinými metodami“. O jaké jiné metody se jednalo – šlo právě o přímé sledování promastigotů v počítačící komůrce? Jestliže ano, jak si autorka vysvětluje nesouhlasné výsledky v jejím případě?
2. Na str. 37 / 38 uvádí autorka, že „optimální analog o-fosfonatometylcholinu pro inhibici leishmanií by měl mít postranní řetězec, avšak ne příliš krátký ...“. Co je dle autorky „příliš krátký postranní řetězec“ a proč by nemohl být krátký, třeba i 1-uhlíkatý. Vyplývá to nějak z výsledků práce?
3. V úvodní části diskuse se autorka věnuje též ceně léčby. Lze odhadnout, jak finančně náročná by mohla být léčba některým ze studovaných analogů v případě, že by se ukázal jako použitelný v humánní medicíně? Je výroba studovaných látek podobně drahá jako např. výroba miltefosinu, amfotericinu B aj.?



Martin Kostka