

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Název práce: Antifungal drug discovery: focus on incrustosporin derivatives

Autor: Mgr. Luís André Vale Silva

Četnost i význam houbových infekcí, zejména invazivních, se stále zvyšuje. Tím stoupá i nutnost vývoje nových antifungálních preparátů, jejichž počet je, zejména pro léčbu život ohrožujících systémových mykóz, stále poměrně malý. Z tohoto pohledu je téma disertační práce aktuální a vhodně zvolené. Testování účinnosti nové skupiny antifungálních přípravků, derivátů inkruštosporinu, v podmínkách *in vitro* je příspěvkem k rozšiřování poznatků o uvedených chemických látkách z hlediska jejich potenciálního budoucího využití v léčbě mykotických infekcí člověka.

V teoretické části disertační práce prokázal autor velmi dobrou orientaci v oblastech charakterizace a klasifikace hub a infekcí jimi způsobených, stejně jako v problematice rozdělení a vývoje antimykotik včetně možností testování citlivosti mikromycet ke zmíněným látkám. Zvláště oceňuji velmi kvalitně a podrobně zpracovanou kapitolu o vlastnostech antifungálních látek a jejich mechanismech účinku, vhodně doplněnou názornými obrázky a tabulkami. Snad jedině, co bych z pozice klinického mykologa ve zmíněné kapitole uvítal, jsou údaje o farmakokinetice systémových antimykotik.

Metodická část je přehledně zpracována, je z ní naprosto jasně patrný rozsah studovaného souboru, specifikace testovaných látek a způsob jejich testování. Použité techniky byly velmi vhodně zvoleny, opíraly se o mezinárodně uznávané standardy a využily moderní spolehlivé přístupy typu průtokové cytometrie a analyzátoru Bioscreen. Výsledky testování jsou přehledně dokumentovány tabulkami a grafy, z nichž jsou patrné minimální inhibiční koncentrace jednotlivých chemikálií a jejich vzájemné srovnání. Jako kontrolní látka byla zvolena významná recentní systémová antimykotika z obou nejčastěji používaných skupin – polyenů a azolů. Jako klinický mykolog dále oceňuji zařazení velkého počtu různých druhů mikromycet do studovaného souboru, čímž bylo možné dokumentovat široké antifungální spektrum účinku testované skupiny látek. A právě inhibiční aktivita proti různým druhům mikroskopických hub je jedním z nejdůležitějších požadavků na budoucí komerčně vyráběná systémová antimykotika, neboť dokumentované spektrum původců invazivních mykóz u imunokompromitovaných pacientů se stále rozšiřuje.

Po formální stránce je disertační práce vypracována velmi pečlivě. Obsah, forma provedení, dokumentace výsledků i literární rešerše odpovídají danému tématu a splňují požadavky na typ předložené práce. Jednotlivé kapitoly jsou účelně a přehledně členěny. Vmezeření grafů a tabulek do textové části je v případě této práce vhodnější, než kdyby byly uvedeny v samostatných přílohách, protože je tímto způsobem zachována návaznost pohledu na výsledky získané u jednotlivých druhů mikromycet. Práce je sepsána přehledně a srozumitelně a – pokud mohu posoudit – má i po jazykové stránce velmi dobrou úroveň. Místy se sice vyskytují drobné terminologické nedostatky, nejčastěji překlepy (např. bodily fluid místo body fluid, str. 10, dugs místo drugs, str. 31 a 51, bellow místo below, str. 34, CF místo CFU, str. 52, further more místo furthermore, str. 79, where místo were, str. 83 a Medical Mycology místo medical mycology, str. 96, protože z kontextu vyplývá, že se jedná o vědní obor, nikoli např. o název časopisu). Na str. 97 je pak poněkud neobvyklý obrat „...agents with **firmer** potential.“ Z celkového pohledu však rozhodně nesnižují formální úroveň práce.

Přestože je předložená disertační práce po odborné stránce velmi kvalitní, k jejímu textu, zejména ke kapitole Teoretický úvod, mám několik připomínek. Je však třeba předem uvést, že jde vesměs o okrajové poznámky a komentáře, mající spíše charakter doplňujících informací, navíc jde o problematiku, která nebyla v přímé souvislosti s experimentální prací autora a nijak proto nesnižují vysokou odbornou úroveň práce:

1. Do určité míry bych polemizoval s větou: „In a wider sense, other fungi, like *Candida* sp., *Aspergillus* sp. and *Cryptococcus neoformans*, are also recognized etiologic agents of dermatomycoses.“ (str. 11). Nehledě na to, že v případě kandid i aspergilů by bylo vhodnější použít množné číslo (tedy spp. místo sp.), domnívám se, že zařazení aspergilů mezi etiologická agens dermatomykóz není příliš vhodné, neboť kožní infekce vyvolané zmíněným rodem (na rozdíl od kandid) jsou omezeny na primárně porušenou kůži (traumata, popáleniny), případně mohou být jedním z projevů generalizovaného postižení.

2. Polemizovat lze i s autorovým pojetím rozdělení hub na primární a sekundární patogeny (rovněž str. 11) a zejména pak se zařazením dermatofyt mezi prvně zmíněné, zvláště pokud uvedené tvrzení není podloženo citací. Z literárních údajů lze totiž spíše vyvodit, že k infekci dermatofyty je nutný defekt imunity, byť pouze lokální, což bývá mj. uváděno jako příčina neúspěšnosti antifungální léčby, např. recidivujících onychomykóz a opravňuje tak zařadit tuto skupinu hub spíše mezi patogeny sekundární (tj. oportunní).

3. Další polemiku může vyvolat věta, týkající se charakterizace tzv. dimorfních hub: „Curiously, the referred pathogen *C. albicans* is an exception to these findings, as filamentous

forms prevail *in vivo*.“ přestože je podložena citací. V literatuře je pojem „dimorfismus“ používán v různých souvislostech, což je podle mého názoru mnohdy poněkud zavádějící. Proto by se měl uvedený název používat pouze v původním, užším slova smyslu, tj. u hub rostoucí v kvasinkovité formě za teploty 37 °C (a tedy také *in vivo*) a ve vláknité za pokojové teploty (*in vitro*), což je charakteristické pro původce tzv. endemických mykóz (*Histoplasma* spp., *Coccidioides immitis*), ale nikoli pro *C. albicans*. V případě zmíněné mikromycety se navíc nedomnívám, že by tvorba pseudomycelia, resp. pravého mycelia skutečně *in vivo* výrazně převažovala nad jeho tvorbou *in vitro* (např. u kmenů vyskytujících se na kůži či sliznicích jako komenzálové jsou pravidelně nalézány pouze blastospóry).

4. Názvosloví vyšetřovaných druhů hub v Tab. 11 (str. 41) není někdy zcela aktuální, navíc autor uvádí převážně pouze názvy anamorfních stadií, i když především v klinické praxi jsou tato označení běžná. Výjimkou je *Blastoschizomyces capitatus* (což je navíc pouze synonymické označení druhu *Dipodascus capitatus*; jeho anamorfní stadium je nazýváno *Geotrichum capitatum*) a *Saccharomyces cerevisiae* (anamorfní stadium *Candida robusta*), kdy jsou naopak použity názvy teleomorf. Dále, v případě uváděného druhu, resp. komplexu *Trichosporon beigeli* jde o obsolentní a dnes i poněkud zavádějící název, neboť většina klinických izolátů (tj. původců mykóz) uváděných dříve pod tímto názvem, je recentně označována jako *T. asahii*. Název *T. beigeli* je do určité míry synonymický pro *T. ovoides*, který však způsobuje jediné onemocnění, a to bílou píedru. Lze se proto důvodně domnívat, že studované klinické izoláty by správně měly být označeny jako *T. asahii*.

K diskusi nad předloženou prací mám následující otázky:

1. Byla většina klinických izolátů získána v průběhu postgraduálního studia uchazeče (a šlo-li tedy o čerstvé kmeny) nebo byly převážně využity kmeny dlouhodobě uchovávané ve sbírce? A s tím související podotázka: proč byla ke konzervaci zvolena poměrně neobvyklá teplota - -40 °C? Obvykle se totiž doporučuje uchovávat kultury, zejména s ohledem na zajištění stability genetických znaků, při teplotě -70 °C a nižší.

2. Zaujalo mne, že autor uvádí při charakterizaci diagnostických proužků E-test plný název, ze kterého pravděpodobně zkrácené označení vychází, tedy Epsilonmeter test. Mohl by vysvětlit, co označení Epsilonmeter znamená a zvláště má-li nějaký vztah k principu metody?

3. Nejúčinnější deriváty inkrustoporinu mají slibnou aktivitu proti aspergilům a k flukonazolu necitlivým kvasinkám. Je rezistence k antimykotikům, ve srovnání s antibiotiky, běžným jevem a má dopady do klinické praxe? A pokud se vyskytuje – jaké se nejčastěji uplatňují mechanismy, které vedou ke vzniku rezistentních kmenů?

4. Některá antimykotika mají výrazné morfogenní účinky, což potvrdily i výsledky testu inhibice klíčnicích hyf *C. albicans*. Má význam testovat schopnost zábrany růstu uvedené morfologické formy a proč?

Závěr:

Disertační práce Mgr. Luíse Silvy splňuje všechny předpoklady odborné práce daného typu a navíc již má praktické výstupy v podobě tří publikací. Proto ji jednoznačně doporučuji pro přijetí k obhajobě.

V Olomouci 7.6.2006

MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
Ústav mikrobiologie LF UP
Hněvotínská 3
775 15 Olomouc