



UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Jana Kollára se zabývá syntézou, fotofyzikálním a biologickým hodnocením tetrapyrazinoporfyrinů (TPyzPz) s periferní substitucí anionickými nebo kationickými substituenty. Práce je obvyklého členění, má rozsah 126 stran (bez příloh) a odkazuje na 154 literárních zdrojů, z nichž naprostá většina jsou články v odborných časopisech. V teoretické části (přibližně 40 stran) autor rozebírá obecné vlastnosti ftalocyaninů a azaftalocyaninů, podrobněji se v souladu se zaměřením práce věnuje principům fotodynamické terapie (PDT) a interakci fotosenzitizérů se sérovými proteiny.

Experimentální část práce (přibližně 60 stran) je shrnutím dosavadní práce doktoranda v této oblasti. Doktorand se tomuto tématu věnoval již během své diplomové práce, kde připravil a studoval TPyzPz s vícenásobnou periferní anionickou substitucí karboxylovými funkčními skupinami (výsledky byly publikovány, doktorand je druhým autorem dle pořadí). Stěžejní část této disertační práce byla publikována ve dvou prvoautorských publikacích (Dyes and Pigments, 2019 a Journal of Medicinal Chemistry, 2020). Nutno zdůraznit, že v obou případech se jedná o vysoce kvalitní časopisy z Q1, a publikování výsledků disertační práce v těchto časopisech s náročným recenzním řízením je tak solidní zárukou kvality samotné disertační práce. V rámci disertační práce byly připraveny TPyzPz s periferními anionickými nebo kationickými substituenty a byly studovány jejich fotofyzikální a biologické vlastnosti, včetně intracelulární lokalizace a interakce s proteiny séra. Získané poznatky jsou správně diskutovány a konfrontovány s poznatky z literatury. V závěru doktorand správně naznačuje směry dalšího možného výzkumu v této oblasti.

I v dalších sledovaných parametrech doktorand splňuje požadavky na úspěšné ukončení doktorského studia (aktivní účast na domácích i zahraničních konferencích, aktivní podíl na výuce). Doktorand byl/je hlavním řešitel projektu GAUK, a spoluřešitel či člen řešitelského kolektivu několika projektů včetně čtyř projektů GAČR.

Připomínky:

- Práce obsahuje malé množství překlepů, gramatických chyb (nesprávný pád, jako příklad viz poděkování spolupracovníkům), chyb v interpunkci či nepřesných formulací, ale celkově je jazyková úroveň práce vysoká.
 - rozmezí čísel – správně mají být dlouhé spojovníky
 - str. 31 – naftalocaniny má být naftalocyaniny
 - str. 33 – „BSA představuje 76 % strukturního homologu HSA“ – Zpřesněte formulaci.
 - str. 33 – „Trp-212“ má být Trp-213
 - str. 36 – „hydrofilnost“ má být hydrofilita
 - str. 37 a obr. 14 – „tetraizothiokyanátový“ má být tetraisothiokyanátový
 - „pokojová teplota“, lépe laboratorní teplota
 - str. 69 – syntéza TPyzPz 5 – má být **benzil**, nikoliv benzylyl
- Str. 29 – prekurzory ftalocyaninů a TPyzPz – zřejmě překlep (2-jodftalonitril, 2-nitroftalonitril), poloha dvě je obsazena druhou nitrilovou skupinou. 4,5-Dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril má být správně 5,6-dichlorpyrazin-

- V experimentální části práce mám výhradu ke způsobu prezentace hodnot třetí veličiny v určitých grafech. Jako příklad uvedu obr. 24a na str. 72. Jedná se o závislost absorbance (osa y) na vlnové délce (osa x). Třetí proměnnou je hodnota pH. Ze způsobu prezentace víme, že červená křivka je pro pH = 7, modrá křivka pro pH = 0,2, ale nevíme, jaké jsou hodnoty pH pro ostatních pět černých křivek (víme pouze, že leží v intervalu (0,2; 5,1)). Obrázek je převzat z publikace P1 (Dyes Pigm, 2019), ale ani v ní jsem tuto informaci nenašel. Zhruba můžeme hodnoty pH vypočítat z vloženého obrázku závislosti absorbance při 648 nm na pH – i když i zde jsou určité pochybnosti (nejvyšší hodnota pH je zde 4,9, nikoliv 5,1). Podobné problémy s prezentací třetí proměnné v grafech se vyskytují v případě, kdy třetí veličinou je čas, jako tomu je například na obrázku 23a na str. 71. Ilustrované nejasnosti o hodnotě třetí veličiny nezpochybňují celkový trend, který je z grafů vždy jasně patrný. V zájmu přesnosti by ale bylo vhodné publikovat (např. v suplementu k jednotlivým publikacím) i surová data, která by obsahovala přesné hodnoty všech proměnných.
- V experimentální části je v části popisující syntézy studovaných sloučenin obtížné si udělat přehled o struktuře látek a syntetických postupech, neboť první relevantní vzorce a schémata se vyskytují až o mnoho stran později ve výsledkové části.

Dotazy:

1. U obr. 1 – Jablonského diagram – nepřímou uvádíte jako zdroj informací recentní přehledovou publikaci. Kdo to byl onen Jablonský a lze dohledat nějakou původní práci, ve které byl po něm nazývaný diagram (poprvé) publikován?
2. Vysvětlíte, jak může být PDT využita ve fotodiagnostice (jak uvádíte na str. 21). Částečně vysvětlujete na str. 25, kde uvádíte, že hexylester aminolevulové kyseliny se používá pro diagnostiku karcinomu močového měchýře. Je tedy tento prekurzor protoporfyrinu IX ve zvýšené míře vychytáván nádorovými buňkami? Jsou známy mechanismy, kterými dochází ke zvýšené akumulaci fotosensitizerů v nádorové tkáni (např. jak uvádíte pro hematoporfyrinový derivát na str. 18)?
3. Na str. 23–24 uvádíte, že „extinkční koeficient (porfimeru sodného při 630 nm) je velmi nízký (pouze $2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), což znemožňuje prostup světla hlouběji do tkáně.“ Vysvětlíte/opravte tuto formulaci. Extinkční koeficient exogenní látky nemá vliv na hloubku průniku světla do tkáně.
4. Na str. 27 uvádíte, že absorpční spektrum Pc a AzaPc je ovlivněno protonizací azomethinových dusíků. Jaké je přibližně pK_a těchto funkčních skupin?
5. Ve své experimentální práci jste se zaměřil na TPyzPz s centrálním Zn^{2+} . Zdůvodněte volbu centrálního kationtu.
6. Diskuse k obr. 23 na str. 71. Shrňte prosím principy, na základě kterých přidavek THF či pyridinu snižuje agregaci vašich TPyzPz a naopak fosfátový pufr o fyziologickém pH či médium se sérovým albuminem agregaci zvyšuje. Kromě protonačního stavu periferních skupin, ovlivňuje agregaci i centrální kov a jeho případná chelatace?
7. Při studiu prostupu TPyzPz do HeLa buněk jste zjistili, že po 12 hodinách inkubace se $4 \mu\text{M}$ látky 5 se v buňkách nachází až $0,37 \text{ nmol}$ TPyzPz 5 na 1 mg proteinů lyzátu. Lze tuto hodnotu alespoň řádově převést na molární koncentraci látky 5 v intracelulárním prostoru? (s připuštěním nepřesnosti v důsledku případné akumulace senzitizeru ve vnější buněčné membráně). Lze tuto odhadovanou intracelulární koncentraci řádově srovnat s hodnotami EC_{50} (extracelulární koncentrace) - tedy např. $\text{EC}_{50} = 0,83 \pm 0,31 \mu\text{M}$ pro látku 5 na HeLa buňkách, v bezsérovém médiu?
8. Na str. 90 a v publikaci P2 (J Med Chem, 2020) popisujete analýzu chemické modifikace BSA v přítomnosti fotosensitizerů po ozáření a přinášíte statistickou analýzu nejčastěji oxidovaných aminokyselin. Dá se z prostorové lokalizace (v rámci proteinu) těchto

nejčastěji modifikovaných AK usuzovat na „vazebné místo“ testovaných fotosensitizerů, případně na počet molekul fotosensitizeru interagujících s BSA?

9. V publikaci 2 (J Med Chem, 2020) jste provedl srovnání fotodynamické aktivity ve skupině TPyzPz s anionickými a kationickými substituenty. Může úroveň fotodynamické aktivity být ovlivněna i počtem kationických/anionických skupin v molekule? Skupiny a) a b) na Obr. 32 totiž obsahují 16 periferních nabitých skupin, kdežto skupiny c) a d) pouze 4 periferní nabitě skupiny.
10. V závěrech své práce konstatujete, že přítomnost sérových proteinů, potažmo vazba na BSA, negativně ovlivňovala fotodynamickou aktivitu u všech látek s anionickými substituenty, kdežto u látek s kationickými substituenty přítomnost BSA aktivitu neovlivnila. Z tabulky 4 na str. 98 se však zdá, že minimálně u kationické látky 18 by se dalo uvažovat i o zvýšení fotodynamické aktivity v přítomnosti BSA. Považujete to za reálné? Jakými principy může přítomnost BSA zvyšovat fotodynamickou aktivitu?

Výše uvedené připomínky nesnižují vysokou kvalitu předložené disertační práce, kterou tímto doporučuji k obhájení s následným udělením titulu Ph.D. v oboru Farmaceutické chemie.

V Hradci Králové,

2. srpna 2020

doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.