



Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze  
Oddělení fyziky biomolekul

Doc. RNDr. Peter Mojžeš, CSc.  
Ke Karlovu 5  
CZ-121 16 Praha 2  
Česká republika

fax: (+420) 224 922 797  
telefon: (+420) 221 911 471  
e-mail: mojzes@karlov.mff.cuni.cz

*Oponentský posudek na diplomovou práci Vojtěcha Vyklického:*  
***In situ* luminiscenční detekce singletního kyslíku**

Fotodynamická terapie nádorových onemocnění představuje slibnou alternativu i doplněk k chirurgickým, chemoterapeutickým a radiologickým postupům při léčení některých nádorových onemocnění. Pro její širší praktické využití jsou vyvíjeny nové fotoaktivní látky a metody hodnocení jejich terapeutické účinnosti. Protože klíčovým prvkem fotodynamické terapie zůstává efektivní a kontrolovatelná generace singletního kyslíku, sledování jeho aktuální koncentrace *in situ* je nanejvýš důležité. Diplomová práce Bc. Vojtěcha Vyklického je věnována možnosti detekce singletního kyslíku v modelových i biologických vzorcích prostřednictvím jeho vlastní luminiscence. Zabývá se problematikou dlouhodobě rozvíjenou na KCHFO MFF UK a mimo jiné navazuje na diplomovou a disertační práci Mgr. A. Molnára. Adaptací experimentálního vybavení a experimenty na buňkách představuje zajímavý a užitečný posun ke skutečně biologickým aplikacím této metody.

Z experimentálního hlediska je práce přínosná adaptací stávajícího spektroskopického zařízení pro měření spektrálně a časově rozlišených fosforescenčních spekter fotosenzitizátoru a  $^1\text{O}_2$ , a to zavedením světlovodné sondy. Diplomant řešil některé technické problémy související se artefakty na blokujících filtrech a navrhl jejich efektivní řešení. Detekční možnosti aparatury pak byly testovány na vzorcích v polymerních foliích a tkáňových kulturách. Kromě toho se diplomant zabýval studiem fotoaktivních vlastností vybraných porfyrinů v roztocích i pevných vzorcích na původní aparatuře.

Práce přináší originální experimentální výsledky pro dva modelové porfyriny, hydrofílní TMPyP, resp. hydrofóbní TPP ve vodním prostředí, resp. prostředí simulujícím lipidické struktury buněk, a porovnává je s příbuznými porfyriny studovanými na KCHFO dříve. Tyto výsledky byly zpracovány do publikace, které je diplomant spoluautorem. Přínos pilotních experimentů na polymerních foliích se zabudovaným fotosenzitizátorem a na buňkách je zejména metodický. Prokazuje použitelnost metody a může sloužit jako východisko pro další experimenty.

Z formálního hlediska práce zachovává klasičtější strukturu předepsanou pro diplomové práce. V teoretickém úvodu je stručný přehled podstatných informací potřebných pro pochopení fyzikální a biologické podstaty fotodynamické terapie, vztahu fotofyzikálních vlastností fotosenzibilizátorů a tvorby singletního kyslíku i metod jeho detekce. Experimentální část stručně popisuje používanou aparaturu i její adaptaci. Práce je napsána přehledně a srozumitelně, s minimem překlepů a dobrou grafickou úpravou. Výsledky vlastních experimentů jsou uvedeny na 18 stránkách. Práce se odkazuje na 74 referencí.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Důležitým artefaktem, odstranění kterého byla v práci věnována velká pozornost, je vlastní luminiscence filtrů blokujících viditelné záření. Existují k této vlastnosti filtrů nějaké publikované informace? Pokud ano, v práci by se měl objevit odkaz na příslušnou referenci.

2. V části věnované výsledkům, zejména v kapitole 3.2, není místy zřejmé, kdy se jsou uváděné výsledky získané diplomantem a kdy se jedná o konstatování faktů převzatých z literatury. U řady zajímavých konstatování chybí odkaz na příslušný obrázek, případně pozorování není vůbec dokumentováno spektrem nebo grafem, nebo chybí odkaz na zdroj, pokud se jedná o převzaté výsledky. Např. na str. 46 je uvedeno, že poloha fosforescenčního pásu TMPyP má maximum na 810 nm, a že se tato poloha s koncentrací TMPyP nemění. Pokud se jedná o výsledek diplomové práce, bylo by to potřeba dokumentovat nějakým obrázkem a grafem. Na stejné stránce je uvedeno, že koncentrace  $O_2$  nemá vliv na tvar fluorescenčního spektra TMPyP, ale dále se tvrdí, že při nulové koncentraci  $O_2$  se objeví vedlejší pás s maximem na 1022 nm. Pokud se jedná o výsledky získané v rámci diplomové práce, mělo by to být dokumentováno více spektry a grafy než jen obr. 3.5, případně by mělo být navrženo nějaké vysvětlení.
3. Mikroskopické snímky 3T3 fibroblastů na str. 54 a 55 vzbuzují pochybnosti o jejich vitalitě po všech manipulacích předcházejících přípravu mikroskopického preparátu. Na str. 60 se autor zmiňuje o rozpadu buněk během měření jako o možném důvodu nesouladu experimentálních výsledků s očekáváním. Byl stav buněk před a po měření nějakým způsobem posuzován?
4. I když se jedná o pilotní experimenty a je zřejmé, že experimentální výsledky byly naměřené na omezených statistických souborech, u výsledků by mělo být uvedeno, jestli se jedná o výsledek typický, extrémní nebo jediný naměřený. Informace o počtu měření, ze kterých byly dělány závěry, se objevují jenom místy (např. str. 51). Usnadnilo by to pochopení tak velkých rozdílů, jaké je vidět na obr. 3.12 a obr. 3.14 srovnávající fluorescenční spektra TPPS<sub>4</sub> a TMPyP z buněk stejného typu. Oba porfyriny mají fluorescenci ve stejné oblasti (~660 nm), proto bychom při stejném autofluorescenčním pozadí buněk očekávali srovnatelná spektra. Z jakého důvodu se spektra tak odlišují?
5. Na str. 24 se uvádí, že TPPS<sub>4</sub> je derivátem hematoporfyrinu. Ve skutečnosti se jedná o derivát TPP (viz obr. 1.5 a 1.6). Strukturně blízké jsou si naopak protoporfyrin IX (obr. 1.9) a hematoporfyrin, pro který by taky bylo vhodné v práci uvést strukturní vzorec.
6. V textu jsem našel pouze několik drobných chyb (např. nesprávný vztah 1.9 na str. 13; zavádějící chyba v exponentu u letální koncentrace  $^1O_2$  na str. 28). Z formálního hlediska lze vytknout používání anglických popisů u obr. 1.10, když je celá práce napsaná česky. Na str. 43 se autor chybně odkazuje na obr. 3.1. Správně by mělo být Tab. 3.1, ale ani to neodpovídá skutečnosti, protože pod tímto označením je opravdu uveden obrázek, ne očekávaná tabulka.

Přes uvedené nedostatky lze konstatovat, že diplomant v podstatě splnil všechny úkoly uvedené v zadání své diplomové práce. Doporučuji proto, aby byla přijata k obhajobě a navrhuji hodnotit ji stupněm:

*vyjímání*

V Praze, 22. května 2009

Doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc.