

## Luminescence Study of Excitation Energy Transfer between Porphyrin and Oxygen

Disertační práce se zabývá studiem procesu generace singletového kyslíku, který vzniká při ozařování porfyrinů. Toto téma má úzkou spojitost z fotodynamickou terapií nádorů užívanou v medicíně, kde je singletový kyslík považován za klíčovou komponentu způsobující selektivní ničení nádorů. Vybrané téma je tedy velmi aktuální.

Práce se skládá z literární rešerše, experimentální části, kde jsou popsány metody měření, doplněný o krátký souhrn výsledků (6 stran). Přiloženo je celkem 7 původních kratších článků (4 již vyšlé, 3 v tisku), ve kterých je pan M. Kořínek spoluautorem. Protože se jedná o publikace několika autorů (zpravidla 4 a více), bylo by vhodné specifikovat jeho podíl. Těžiště práce vidím v aplikaci pokročilých spektroskopických metod na velmi jednoduché systémy (zpravidla roztoky porfyrinů, které se již používají pro fotodynamickou terapii). Logický je časové postup experimentů od jednoduchých (porfyriny TPP, TPPS<sub>4</sub>, hematoporfyrin, protoporfyrin IX) k složitějším systémům (porfyrin v přítomnosti serum albuminu). Takové systémy byly již studovány dříve, ale s omezeným experimentálním zázemím. Získané výsledky tedy rozšiřují a doplňují již publikované údaje. Tomu odpovídá i čtenářské auditorium časopisů (*Journal of Fluorescence*, *Journal of Luminescence* a *Journal of Molecular Structure*), ve které jsou výsledky práce publikovány, tvoří spíše fyzici a chemici než potenciální uživatelé výsledků – lékaři a fotobiologové.

Ačkoliv výsledky práce byly již publikovány v časopisech s recenzním řízením (impact faktor u všech časopisů je větší než 1), domnívám se, že některé interpretace jsou částečně spekulativního charakteru a vyvolávají dodatečné otázky. To je způsobeno částečně také tím, že diskuse není podložena experimentálními měřeními jiného typu než je časově rozlišená luminescence.

Závislosti doby doby života tripletových stavů TPPS<sub>4</sub> jsou vysvětlovány přítomností „další formy TPPS<sub>4</sub>, pravděpodobně agregátu“ (publikováno autorem v *J. Lumin.* 2004, 108, 117-119). Přítomnost agregátů TPPS<sub>4</sub> lze přitom jednoduše odvodit z měření UV/Vis spekter (ověřit platnost Lambertova-Beerova zákona popř. zjištění změn absorpčních pásů) nebo analýzou publikovaných dat (např. *J. Phys. Chem.* 101, 101-108 (1997)). Agregáty v roztoku také obecně snižují kvantový výtěžek tripletních stavů porfyrinů, což by se mělo projevit ve snížení signálu měřené fosforescence. Domnívám se, že rozdíly jsou spíše způsobeny rozdílnou protonizací porfyrinového kruhu v prostředích s pH 7.4 – 5.5. TPPS<sub>4</sub> ve vodném roztoku existuje ve dvou formách: v základním (viz např. str. 6 autorovy disertace, Soretův pás v UV/Vis spektru cca 413 nm) a s dvakrát protonizovaný kruhem (Soretův pás cca 434 nm,  $pK_a \sim 5$ ), které se liší svými fotofyzikálními vlastnostmi. V tripletovém stavu dochází k protonizaci tetrafenylporfyrinů dokonce již v neutrálním prostředí ( $pK_a \sim 6$ , *Biophysica and Biochemica Acta-General Subject* 1670, 40-48 (2004)).

Experimentální měření vyžadovalo ozařování vzorků řádově (deseti)tisíci pulsy fokusovaného lasrového záření. Nedochozelo během měření k destrukci vzorků?

Porfyriny TPP a TPPS<sub>4</sub> jsou velmi stabilní vůči ozařování, hematoporfyrin již méně a především protoporfyrin IX je znám svou tvorbou příslušných chlorinů (viz např. *J. Photochem. Photobiol. B* **60**, 108-113(2001)). Byly měřeny UV/Vis spektra i po luminiscenčním měření? Změny Soretova pásu a Q pásů v UV/Vis spektru je velmi citlivý indikátor možných nežádoucích reakcí.

Měření izolovaných porfyrinů v roztocích často nekoreluje s výsledky v složitějších systémech např v důsledku vazby na terčový biopolymer, buněčnou membránu nebo z jiných příčin. Proto je trend měřit stále složitější systémy, aby bylo možno detailně objasnit mechanismus tak složitých fotobiologických procesů jako je fotodynamická léčba nádorů. Nabízí se proto otázka, zda lze experimentálního zázemí využít ke studiu reálných systémů. Hlavními překážkami je kromě komplexnosti systémů je také tendence k dalším nežádoucím fotochemickým reakcím, jak již je vidět z experimentů autora se systémem TPPS<sub>4</sub>-serum albumin (poslední autorova práce), kde vznikající singletový kyslík oxidoval serum albumin. Měřené časové závislosti fosforescence singletového kyslíku v tomto případě obsahují velký šum a neumožňují spolehlivě navrhnout mechanismus vzniku singletového kyslíku, jeho interakci s ostatními komponentami např. nepopisují interakci (chemickou reakci) s aromatickými aminokyselinami v serum albuminu. K zamezení této parazitické reakce singletového kyslíku s terčovými molekulami, způsobující prodloužení doby života fosforescence, by bylo vhodnější použít průtočný systém místo stávajícího vsádkového uspořádání.

### Závěr

Domnívám se, že disertační práce Miloslava Kořínka obsahuje původní vědecké poznatky, jejichž originalita i vysoká odborná úroveň je dokumentována i skutečností, že tyto výsledky již byla publikovány v odborných časopisech s recenzním řízením. Zvláště cenné je, že práce je napsána anglicky a její výsledky jsou tedy přístupné i celosvětové vědecké komunitě.

Doporučuji proto, aby práce byla přijata.

V Praze dne 18.1.2005



RNDr. Pavel Kubát, CSc.  
Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR