



## Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze

*Oddělení fyziky biomolekul*

Doc. RNDr. Peter Mojzeš, 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 doktorskou disertační práci Mgr. Alexandra Molnára:***

#### **Spectroscopic Study of Singlet Oxygen in Biological Systems**

Fotodynamická terapie nádorových onemocnění představuje slibnou alternativu i doplněk k chirurgickým, chemoterapeutickým a radiologickým postupům při léčení některých nádorových onemocnění. Její širší praktické využití je limitováno omezenou nabídkou vhodných fotoaktivačních látek splňujících řadu často protichůdných požadavků. Klíčovým předpokladem pro cílený vývoj účinnějších fotosenzibilizátorů je pochopení všech procesů podílejících se na fotodynamické aktivitě, mezi kterými hraje přenos excitační energie z fotosenzibilizátoru na molekulární kyslík významnou roli. Z tohoto hlediska je disertační práce Mgr. Alexandra Molnára aktuální a užitečná, protože přináší o tomto procesu zajímavé a originální výsledky získané přímou experimentální metodou.

Práce se zabývá různými detaily přenosu excitační energie z tripletního stavu fotosenzibilizátoru na molekulární kyslík v několika modelových systémech, a to současným sledováním kinetiky fosforescence obou aktérů. K tomu využívá originálního spektroskopického zařízení vybudovaného na KCHFO MFF UK pro měření spektrálně a časově rozlišených fosforescenčních spekter na pomezí viditelné a blízké infračervené oblasti. Studium se týká čtyř různých derivátů porfyrinů, které se ve fotodynamické terapii používají nebo testují. Práce přináší zajímavé experimentální výsledky týkající se vztahu doby života tripletních stavů fotosenzibilizátorů a časových konstant generování a relaxace singletního kyslíku na koncentraci fotosenzibilizátoru, jeho agregačním stavu, pH okolí, koncentrace kyslíku v roztoku a v komplexech s modelovými biomolekulami (proteiny, fosfolipidy). Následně jsou pro jednotlivé fotosenzibilizátory navržené strukturní modely vysvětlující pozorované závislosti v pojmech dostupnosti/nedostupnosti fotosenzibilizátoru pro molekuly kyslíku z jejich okolí nebo jeho deaktivace nežádoucími konkurenčními procesy, které snižují efektivitu tvorby singletního kyslíku. Získané výsledky byly publikovány v 6 článcích v mezinárodních časopisech (2x *Journal of Molecular Structure* (IF 1.495), 3x *Journal of Luminescence* (IF 1.441), 1x *Journal of Fluorescence* (IF 2.610)), a lze předpokládat, že prošly standardním recenzním řízením garantujícím jejich vědeckou hodnotu a relevanci.

Práce je napsána anglicky a sestává z úvodní části a 6 příložených publikací. Přestože byla zvolena tato forma zpracování disertace, úvodní část formálně zachovává klasickou strukturu, s poněkud lakonickým úvodem popisujícím energetické stavy molekul a přechodů mezi nimi, tvorby a vlastnosti singletního kyslíku, stručného přehledu fotodynamické terapie a vlastností použitých fotosenzibilizátorů. Vzhledem k tomu, že tématem dizertace bylo spektroskopické studium singletního kyslíku v biologických systémech, bylo by vhodné věnovat větší prostor i úloze singletního kyslíku v obranných mechanismech buněk proti patogénům a způsobech jeho přirozené generace, zvláště s ohledem na okolnosti, za kterých singletní kyslík způsobuje místo nekrózy apoptózu. Celkově, při zvolené formě zpracování, mohla být úvodní část rozsáhlejší a podrobnější, a mohla se soustředit na zasazení vlastního studia kinetiky fosforescence do širších souvislostí zkoumání vztahu vlastností fotosenzibilizátorů a jeho cíleného transportu, interakcí singletního kyslíku s biomolekulami, spouštění buněčných mechanismů a účinnosti

fotodynamické terapie. V běžných spektroskopických člancích na to není prostor a ani se to od fyzika neočekává, ale pro dokumentování toho, že *nebiolog* porozuměl širšímu kontextu problematiky, by to bylo užitečné.

Části věnované studovaným systémům, použité experimentální metodě a dosaženým výsledkům pouze opakují to, co je uvedeno v příložených člancích, navíc bez odvolávání se na obrázky, spektra nebo konkrétní článek z přílohy. Vhodnější by bylo celkové shrnutí výsledků pro všechny studované fotosenzibilizátory z nějakého sjednocujícího pohledu a s nadhledem experta, včetně nějakého zobecnění nebo upozornění na souvislosti, které nepoučenému čtenáři jednotlivých článků mezi detaily unikají. Nicméně tento nedostatek nesnižuje kvalitu publikovaných výsledků.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Doba života PpIX ( $0.22 \pm 0.02 \mu\text{s}$ ) v acetonu a časová konstanta generování singletního kyslíku ( $0.24 \pm 0.02 \mu\text{s}$ ) se v rámci chybového intervalu dobře shodují (str. 37, Fig. 4 v Encl. 1). Z absorpčních měření na druhou stranu dokládáte, že PpIX v acetonu tvoří agregáty. Můžete uvést ještě nějaké jiné argumenty, které by podpořily nutnost zdůvodňovat tak nepatrný rozdíl dobách života předpokladem, že pouze molekuly PpIX z povrchu agregátů přispívají ke generaci singletního kyslíku?
2. Pro vysvětlení mechanismu zpětné deaktivace singletního kyslíku samotným fotosenzibilizátorem uvádíte, že se na tom podílejí především monomery (Encl. 1). Jak vysvětlujete tvar závislosti doby života singletního kyslíku na koncentraci PpIX (Fig. 5, Encl. 1), kdy pro koncentrace PpIX vyšší než  $100 \mu\text{M}$  se začne doba života singletního kyslíku opět zkracovat, a v roztoku by měli přibývat pouze agregáty?
3. Pro systémy s lipofilními fotosenzibilizátory (PpIX, HpD) uzavřenými v liposomech s různou koncentrací kyslíku vně (Encl. 6) předpokládáte dvouexponenciální nárůst fosforescence singletního kyslíku, a jednotlivé komponenty nárůstu připisujete aktivaci molekulami fotosenzibilizátoru s rozdílnými dobami života, vyskytujících se v dvou různých prostředích. Výsledky fitování uvedené v Table 2 (Encl. 6) však neobsahují informaci o relativních amplitudách jednotlivých komponent, z kterých by se dala posoudit oprávněnost takového předpokladu. V případě HpD navíc obě časové konstanty nárůstu fosforescence singletního kyslíku pro vysokou koncentraci  $\text{O}_2$  dobře odpovídají pouze přenosu excitace z molekul HpD s kratší dobou života, které by měly být ukryty uvnitř lipozomů. Jak vysvětlujete toto pozorování?
4. Připomínky formálního charakteru: anglicky se píše *albumin*, *porphyrin* a *porphine* (ne *albumine*, *porphyrine* a *porphin*, str. 6, 7 a 28), názvy chemických látek není nutno v textu uvádět jako vlastní jména s velkými počátečními písmeny (str. 6). Dále lze vytknout chyby nebo překlepy v rovnicích (1) a (6), používání termínů *excited energy* místo *excitation energy* (str. 37), *luminiscence* místo *luminescence* (str. 61). V publikaci Encl. 5 se nedopatřením zaměňují pojmy *life-time* a *rise-time* u singletního kyslíku, viz např. popis v Table 2.

Závěrem konstatuji, že Mgr. Alexander Molnár ve své doktorské disertační práci prokázal schopnost samostatné vědecké práce jak svými teoretickými znalostmi a zvládnutím vědecké metody, tak přínosem nových poznatků. Doporučuji proto, aby jeho práce byla přijata k obhajobě a navrhuji, mu byl po úspěšné obhajobě udělen doktorský titul.

V Praze, 27. března 2008

