

Posudek disertační práce Kamila Kopeckého „Azaftalocyaniny jako nová skupina zhášeců fluorescence“

Disertační práce se skládá z několika kapitol, ve kterých je nejprve formulována problematika a způsob řešení, dále je uveden přehled současného stavu problematiky a zvolené metody řešení. Následuje Experimentální část, Výsledky a diskuse a Závěr. Součástí disertace je i seznam publikací, podle kterého je uchazeč spoluautorem třinácti publikací v časopisech s IF, čímž je splněna podmínka § 47 odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů i předpisy UK.

Vývoj nových látek pro zhášení fluorescence pro použití v aplikacích jako je PCR je nepochybně zajímavé a aktuální téma. Chci proto ocenit, že uchazeč a pracovní skupina, jejímž je členem, zavedli na fakultě další tematiku. Zvolené azaftalocyaninové struktury představují značnou výzvu, neboť jejich příprava je experimentálně poměrně náročná. Nemám proto pochyb o tom, že při získávání zkušeností se syntézou těchto látek prošel mgr. Kopecký celou řadou frustrujících period a dětských nemocí, kterým se při zavádění nové tematiky nedá bez předchozích zkušeností vyhnout.

Formální stránku disertace hodnotím se značnými rozpaky. Zprv se domnívám, že kapitoly v disertaci a jejich řazení má zhruba odpovídat odborným publikacím. Obvyklé řazení těchto kapitol (doporučené i vědeckou radou fakulty) je Úvod, jehož smyslem je popsat současný stav problematiky, ze kterého vyplyne potřeba něco řešit. Následuje na tomto základě definovaný Cíl, Výsledky a Diskuse, Závěr, Experimentální část a Seznam literatury. Zadruhé mě zarazí celkový styl pojetí disertace, které připomíná spíše laboratorní protokoly převedené do podoby disertace, než skutečnou disertaci. Smyslem doktorské disertace je ukázat, jakým způsobem uchazeč přemýšlel, když si definoval cíl a jakým směrem se vyvíjelo jeho myšlení při řešení problému. Jinými slovy, stylem doktorské disertace by měl být nejen popis výsledků, ale především promyšlená argumentace a zdůvodňování. V první řadě není v této disertaci jasně zdůvodněn cíl. Jakýmsi vytyčením cíle (str. 9) sice celá práce začíná, ale zdůvodnění dále nspecifikovanými negativními vlastnostmi komerčně dostupných zhášeců a objevem příznivých vlastností substituovaných azaftalocyaninů, kde je čtenář dále pouze odkázán na ref. 1 je nedostatečné. Další specifikace cíle je pak překvapivě až na str. 72, kde je dále uvedeno, že azaftalocyaniny byly vybrány kvůli snadné nukleofilní substituci výchozích halopyrazinů a až v samotném Závěru jsem se dočetl, že výhodou azaftalocyaninů je absorpce AzaPc v oblasti 450-700 nm. Při nejlepší vůli to na mě působí poněkud chaoticky. V následující kapitole (Přehled současného stavu řešené problematiky) jsou popsány teoretické předpoklady zhášení fluorescence, přehled typů molekulárních sond a přehled fluorescenčních látek a zhášeců. Tato kapitola by byla čtivější, kdyby uchazeč diskutoval především strukturní předpoklady zhášení fluorescence (nelze si nevšimnout, že drtivá většina těchto látek obsahuje donor elektronů a akceptor elektronů konjugované prostřednictvím π -systému), přehled používaných struktur a jejich nevýhody. Na popis nevýhod mohl navazovat podrobnější popis objevených a/nebo předpokládaných vlastností alkylaminoazaftalocyaninů, který by odůvodnil jejich další vývoj jako zhášeců fluorescence. Rozsáhlá podkapitola o molekulárních sondách sice není úplně od věci, ale vývoj nových sond evidentně není cílem disertace a oddíl Zvolené metody řešení nemusel tvořit samostatnou kapitolu a mohl být podstatně kratší, neboť obsahuje místy až příliš detailní popis známých faktů (např. nukleofilní substituce halopyrazinů, aktivace karboxylu pro přípravu derivátů, chránění OH skupin). V kapitole Výsledky a diskuse je na řadě míst prostý popis výsledků; příkladem je podkapitola 7.7, kde je porovnávána účinnost látky **29** zabudované v několika oligonukleotidových sekvencích s účinností komerčně používaného zhášeče BHQ-2[®], kde k číslům v Tab. 4 chybí jakákoliv diskuse a čtenář se tak ani nedoví, zda rozdíl necelých devíti procent pro sekvenci S3 je hodně nebo málo a musí si sám odvodit, že výhodou AzaPc

je pravděpodobně především podstatně lepší překryv absorpčního spektra s emisním spektrem fluoroforu Cy5TM při necelých 700 nm. Dalším příkladem špatného psaní je konstatování na str. 85, kde autor praví, že „...tato měření vedla k závěru, že sekundární aminoskupina je zodpovědná za nestabilitu makrocycly AzaPc v oxidačním roztoku jódu...“, ale neuvádí, co se vlastně při těchto měřeních stalo.

Ani jazyková stránka disertace mi nepřipadá příliš zdařilá. Výrazy jako „nasyntetizovat“ nebo „vyizolovat“ jsou ohavné gramatické neoplazie, které patří do laboratorní hantýrky a nikoliv do disertace. Použití doslovných překladů z angličtiny sice vypadá na první pohled vznešeně, ale ani např. sloveso „purifikovat“ nemění nic na tom, že uchazeč musel něco jednoduše vyčistit (dále např. „deprotektce“) stejně jako anglická slova „counterion“ a „quencher“ (str. 41) nemění nic na tom, že jde o anion a zhášeč.

Po věcné stránce o získaných výsledcích nepochybuji, až na jednu výjimku (viz dotazy) jsou všechny závěry o struktuře a vlastnostech látek podpořeny odpovídajícími spektrálními a jinými daty. Z poděkování spolupracovníkům v úvodu disertace lze dedukovat, že sám autor se zabýval především syntézou látek, měřením fluorescenčních spekter a produkcí singletového kyslíku. Počet připravených látek tak alespoň na první pohled neodpovídá minimálně třem rokům práce. Jak jsem výše poznamenal, příprava a čištění cílových azaftalocyaninů není zřejmě triviální a je proto s podivem, že autor zmiňuje obtíže s optimalizací syntéz nebo čistících postupů pouze okrajově. Pokud takové obtíže měl, měl je popsat nebo více zdůraznit, např. formou tabulek s variacemi reakčních nebo chromatografických podmínek. HPLC studie je sice zajímavá, ale její výsledky pouze potvrdily známý fakt, že optimálním poměrem prekurzorů pro syntézu látek typu A₃B je 3:1. Řada výsledků je prezentována jako fakta, což je sice v pořádku, ale uchazeč se ani nepokusil o diskusi jejich významu (viz např. výše uvedené experimenty s látkou **29** v oligonukleotidové sekvenci a tvorba komplexů s pyridinem).

K práci mám další formální připomínky:

1. Str. 76, hmotnostní spektroskop (ani hmotnostní spektroskopie) neexistuje, existuje pouze hmotnostní spektrometr, resp. spektrometrie. Výraz spektroskopie je vyhrazen pro optické metody. Tuto chybu bych pochopil u studenta 2. ročníku, nikoliv u uchazeče o doktorskou kvalifikaci.
2. Str. 80, ve slově směsi se píše měkké i.
3. Čísla odkazů se zpravidla uvádějí v horním indexu.

Následující připomínky mají sloužit jako podklad do diskuse:

1. Autor sice v úvodních partiích uvádí přehled použitých zhášečů, ale naprosto opomíjí látky ve vývoji. Existují takové látky?
2. Nesouhlasím s mechanismem na Obr. 25 a některými tvrzeními v navazujícím textu. Deprotonizace alkoholu sekundárním aminem je silně termodynamicky nevýhodná a tedy nepravděpodobná. Nukleofilem je hydroxyskupina a amin slouží pouze k vychyťování vzniklého chlorovodíku a posunutí rovnováhy reakce. Tvorba morfolinového kruhu je upřednostňována především proto, že intramolekulární reakce má z termodynamických důvodů přednost před intermolekulární.
3. Obr. 26 naznačuje, že látka **13** byla připravena, navazující text na str. 76 je nejasný. V Experimentální části je uvedeno, že NMR ani MS analýza strukturu nepotvrdily. O NMR spektrech není uvedeno nic, rozdíl ve hmotnostním spektru je 73, což odpovídá (celkem logické) ztrátě

- diethylaminoskupiny. Jak vypadala NMR spektra a proč se autor domnívá, že látka nebyla připravena?
4. Str. 83, co má autor na mysli pod „promytím roztoku A vodným roztokem NaOH“?
 5. Na str. 85 autor uvádí, že obě chráněné formy látky **15** byly rozkládány „ve stejném poměru jako nechráněná látka **15**“. Co tím má na mysli? Dále uvádí, že „...tato měření vedla k závěru, že sekundární aminoskupina je zodpovědná za nestabilitu makrocyklu AzaPc v oxidačním roztoku jódu.“ Co vlastně při těchto měřeních pozoroval?
 6. Prosím o komentář k datům uvedeným v Tab.4 a Obr. 35.
 7. Může mít tvorba komplexu s pyridinem nějaký význam pro možné aplikace, např. v molekulárním rozpoznávání?
 8. Zajímalo by mě, podle jaké metodiky se určí podíl na publikaci vyjádřený v procentech.

Závěrem chci říci, že nezpochybňuji získané výsledky ani jejich hodnotu, ale styl disertační práce, který je podle mého názoru značně neuspokojivý a nemohu se zdržet dojmu, že mohla být napsána daleko lépe. Předložená práce může být použita jako podklad pro obhajobu, ale uvedené připomínky by v jejím průběhu měly být uspokojivě vysvětleny.

V Hradci Králové 9. 12. 08

Prof. RNDr. Milan Pour, PhD.