



Oponentský posudek disertační práce Mgr. Miloslava Macháčka

Autor disertační práce: Mgr. Miloslav Macháček, Katedra biochemických věd, FaF UK

Název práce: Studium nových fotosensitizerů ze skupiny ftalocyaninů a azaftalocyaninů pro fotodynamickou léčbu nádorových onemocnění

DSP: Biochemie a xenobiochemie

Oponent: prof. MUDr. Martina Řezáčová, PhD., Ústav lékařské biochemie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Cílem disertační práce Mgr. Miloslava Macháčka bylo vyhodnotit biologický účinek nových fotosensitizerů ze skupiny hydrofilních ftalocyaninů a azaftalocyaninů na nádorové buňky *in vitro* a blíže charakterizovat mechanismus jejich působení. Dílčí cíle byly přesně definovány a splněny.

Oponovaná disertační práce je pojata jako komentovaný soubor pěti původních článků v renomovaných časopisech s impaktním faktorem, vztahujících se k řešené tematice; u třech z nich je disertant prvním autorem. Články včetně doplňujících materiálů jsou uvedeny velmi detailně zpracovaným přehledem problematiky a aktuálních znalostí o fototerapii, mechanismech buněčné odezvy na fototerapii, způsobech a molekulárních mechanismech buněčné smrti. Práce se nevyhnula drobným jazykovým chybám a překlepům, z těch zajímavějších zmiňme „exitotoxicitu“ vápníku na straně 41. Teoretická část práce je zpracována korektním způsobem se zpracováním recentních poznatků, přesto zachovává čtivou formu, a čtenáři tak poskytuje velmi zajímavý vhled do problematiky. V teoretické části postrádám u některých představených látek onemocnění, k jehož léčbě se využívají, předkládám edy disertantovi následující otázku:

Otázka 1: U jakých diagnóz se využívá nebo testuje léčba pomocí Talaporfinu, HPPH, Rostaporfinu, Lutrinu?

Metodická úroveň práce je vysoká, je zřejmé, že autor ovládl nejen základní screeningové metody testující buněčnou viabilitu a způsob buněčné smrti, ale i pokročilé moderní metodiky multiparametrické imunodetekce a originálním způsobem kombinuje imunofenotypizaci lymfocytů se stanovením intracelulárních markerů poškození DNA a apoptózy.

Výsledkovou a metodickou část práce představuje 5 původních publikací, včetně uvedení přesného podílu disertanta. Data jsou prezentována srozumitelným způsobem,



Univerzita Karlova v Praze Lékařská fakulta v Hradci Králové

podložena grafy a statisticky zhodnocena. Je zřejmé, že autor shromáždil velké množství experimentálních dat na dostatečně velkých souborech, takže může následně vyvodit validní závěry. Dovolím si vyzdvihnout vyřešení náročnějšího problému určení subcelulární lokalizace tetrapyrazinoporpyrazinu č. 1 (TPyzPz-COONa₁₆) v práci „*Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazino-porphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer*“. K vlastním experimentům a výsledkům, prezentovaným v disertační práci, mám následující dotazy:

Otázka 2: V první vložené práci „*Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy*“ autor porovnává cytotoxicitu neaktivovaných derivátů pro nádorovou (HeLa) a nenádorovou (3T3) buněčnou linii, u fotodynamické aktivace jsou však uvedeny jen výsledky pro linii HeLa. Proč nebyly tyto experimenty provedeny i s nenádorovými buňkami?

Otázka 3: Jak si autor vysvětluje rozdílnou dynamiku průniku PI (a tedy permeabilizace buněčné membrány) do buněk HeLa po inkubaci s 1Zn-Et při sledování pomocí fluorescenční mikroskopie (za 240 s po fotoaktivaci 100% bb PI+ po koncentraci PS odpovídající IC₅₀; Figure 5) a pomocí průtokové cytometrie (za 20 min po fotoaktivaci cca 15% bb PI+ po koncentraci PS odpovídající IC₈₅; Figure 6) v práci „*Far-Red-Absorbing Cationic Phthalocyanine Photosensitizers: Synthesis and Evaluation of the Photodynamic Anticancer Activity and the Mode of Cell Death Induction*“? Byla hodnocena i morfologie buněk v okamžiku stanovení IC₅₀ pomocí neutrální červeně (když podle Fig. 5 během 10 s po fotoaktivaci dochází k destrukci lyzozomů) či nezvažoval autor i využití jiné metodiky pro detekci viability/počtu buněk?

Závěr:

Z předložené práce je patrné, že autor ovládá metodiky buněčné analýzy a je schopen kritického vědeckého myšlení. Disertant prokázal, že je nejen schopným experimentátorem, ale dokáže data kvalitně interpretovat v kontextu současných znalostí, a je tedy schopen samostatné vědecké práce. Problematika a cíle práce jsou jasně formulovány, cíle práce byly splněny a obohatily znalosti v oboru. Publikace v mezinárodně uznávaných časopisech již samy ukazují na kvalitu uvedené práce. Disertační práce splňuje zákonem stanovené podmínky.

Vzhledem k výše uvedenému **doporučuji** přijetí práce k obhajobě.

prof. MUDr. Martina Řezáčová, PhD.

9. listopadu 2016