



UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Lucie Rychvalské se zabývá návrhem, syntézou, fotofyzikálním a biologickým hodnocením ftalocyaninů (Pc), subftalocyaninů (subPc) a jejich komplexů s kukurbit[7]urilem (CB[7]). Práce je obvyklého členění, má rozsah 145 stran (bez příloh) a odkazuje na 128 literárních zdrojů, z nichž naprostá většina jsou články v odborných časopisech. V teoretické části (rozsah přibližně 27 stran) autorka rozebírá obecné vlastnosti Pc/subPc, podrobněji se věnuje principům fotodynamické terapie (PDT), principům tvorby supramolekulárních komplexů a světlem indukovaného uvolňování léčiv z lipozomů. Úvodní část je přiměřeně dlouhá i detailní a dobře čtenářě uvádí do dané problematiky. Metodická část práce (přibližně 23 stran) obsahuje kompletní charakterizaci připravených sloučenin a metodiku syntéz, fotofyzikálních, biologických a dalších experimentů. Stěžejní částí práce je kombinovaná část Výsledky a diskuse (rozsah 43 stran), která je shrnutím dosavadní práce doktorandky v této oblasti. Stěžejní část této disertační práce byla publikována ve dvou prvoautorských publikacích (J. Porphyrins and Phthalocyanines, 2019; J. Org. Chem., 2023). Výsledková a diskusní část je přehledně rozdělena do 4 podčástí (podprojektů) v souladu s definovanými cíli práce. V rámci disertační práce se i přes nemalé syntetické problémy (které by se daly zobecnit tím, že snadno odstupující skupiny neodstupovaly) podařilo připravit několik klíčových Pc/subPc. Připravené prekurzory, finální sloučeniny a jejich supramolekulární komplexy byly zevrubně studovány z hlediska jejich fotofyzikálních a biologických vlastností. Kladně hodnotím velké množství práce a experimentů, které doktorandka provedla (syntézy, charakterizace, veškeré fotofyzikální experimenty). Biologické hodnocení sice nebylo prováděno doktorandkou, ale jeho výsledky byla schopná správně interpretovat a diskutovat. Celkově je diskuse ucelená, konzistentní a získané poznatky jsou správně konfrontovány s poznatky z literatury. V závěru doktorandka správně naznačuje směry dalšího možného výzkumu v této oblasti. Jazykově i graficky je práce na vysoké úrovni s minimem překlepů. Po kontrole protokolů ze systémů kontroly podobnosti Theses a Turnitin konstatuji, že nalezené shody jsou nevýznamné a práci tak považuji za původní.

I v dalších sledovaných parametrech doktorandka splňuje požadavky na úspěšné ukončení doktorského studia (aktivní účast na domácích i zahraničních konferencích, aktivní podíl na výuce, absolvovaná zahraniční stáž). Doktorandka byla hlavní řešitelkou projektu GAUK a členkou řešitelského kolektivu projektů GAČR a PRIMUS.

Připomínky:

- Obrázek 16 na s. 27. Nezdá se mi, že by to byl cholesteryl oleát. Není tam cholesteryl.
- Tab. 2 na s. 30, není jasné, o které konkrétní substituenty se jedná, je udán pouze napojovací atom. Jedná se ve všech případech o stejné substituenty, a jsou tedy absorpční maxima porovnatelná?
- Model sloučeniny 3 navázané v CB[7] na s. 15 - v textu je uvedeno, že struktura komplexu byla optimalizována semiempirickou metodou PM6, ale v titulku pod obrázkem pod obrázkem je uvedeno PM3. Co je tedy správně?
- Ve vašich popisech UV-VIS spekter například na s. 121 jsou extinkční koeficienty uvedeny bezrozměrně – doplňte správnou jednotku.
- Na s. 47 v části 4.1.1 Návrh štruktúry je substituent nesprávně pojmenován jako „aminoadamantyl“, správný název by byl „adamantylamino“. Toto nesprávné označení substituentu se v práci vyskytuje opakovaně, možná i převážně.

- Označení látek 2a, 2b, 2c v tab. 6 na s. 49 je špatně a neodpovídá původnímu označení látek v publikovaném článku. V důsledku toho jsou na některých místech komentáře zdánlivě uvedené špatné navážky, výtěžky atp. V publikovaném článku se tento problém nevyskytuje.
- Na s. 111 je uvedeno, že infračervená spektra byla změřena v peletách KBr v ATR módu. To je zřejmě chybně, v ATR se pelety nepoužívají. Vysvětlete uspořádání ATR-IR.
- Schéma 24 na s. 81 – nejsou uvedeny podmínky nukleofilní substituce 42->45 a 43->45. V textu je dále uvedeno, že vznikal jen vedlejší produkt 3,6-dihydroxyftalonitril pravděpodobně kvůli "amidolýze esterové vazby". Co je to amidolýza esterové vazby? Navíc schéma není zakresleno správně – z látky 42 ani 43 nemůže vzniknout bromderivát 45.

Drobné a typografické:

- Rozmezí číselných hodnot by mělo být bez mezer, uváděno chybně v celé práci.
- Strana 31 dole, chybně uvedeno, že amfotericin B se používá na léčbu bakteriálních infekcí.
- Značení substituentů R1, R2 atp. číselné indexy lépe do horního indexu (neboť dolní index má chemický význam R opakováno nkrát).
- Názvy látek 24 a 25 na s. 120 mají správně končit nominativem „zinečnatý komplex“, nikoliv genitivem „zinečnatého komplexu“.
- s. 83 má být správně "demetalace", nikoliv "demethylace"
- poslední odstavec na s. 110 – "AL(II)" má být Al(II)

Dotazy:

1. V práci se opakovaně hovoří o efektu těžkého atomu na fotofyzikální vlastnosti. Vysvětlete tento pojem.
2. HRMS spektrum látky 1 je interpretováno jako molekulární iont po ztrátě 1 molekuly vody, tím pádem v podstatě hmota je naprosto stejná jako u látky 3x. Můžete proto dokumentovat, které hodnoty a z jakých analýz potvrzují přítomnost hydroxylové skupiny ve vaší látce 1? Byla látka 1 popsána v literatuře? Bylo by tedy možné porovnat teploty tání sloučenin 1 a 3x s literaturou?
3. Otázka k designu. Jak (pokud vůbec) bude fotofyzikální vlastnosti ovlivňovat alkylace dusíku adamantylamino substituentu – sekundární vs terciární vs kvartérní dusík?
4. Tab. 8 na s. 59 a doprovodný text. Uvádíte, že ftalonitrilový prekurzor se spojovacím atomem síry má s CB řádově nižší asociační konstantu než kyslíkaté isostery. Máte pro to nějaké vysvětlení, proč by atom síry, respektive kyslíku, který je již relativně daleko od integrujícího CB, měl supramolekulární interakci ovlivňovat?
5. K tabulce 9 na s. 63 - určování log P - Jaké je log P samotného CB[7]?
6. DESIGN - Obrázek 27 na s. 38 - je patrné, že supramolekulární komplexy s CB může tvořit i samotný nesubstituovaný ftalocyanin. Proč je tedy lepší do molekuly inkorporovat adamantylový fragment, když do kavity CB se může zanořit i samotné benzenové jádro ftalocyaninu? Je známo, jaká je asociační konstanta komplexu na obr. 27?
7. Strana 65 – měření kvantového výtěžku singletového kyslíku bylo prováděno v D₂O okyselené DCl. jaký je důvod použití deuterovaného rozpouštědla? V alternativním postupu, který je v práci rovněž uveden, je výtěžek singletového kyslíku měřen v normálním DMSO.
8. Obrázek 49 na s. 67 a další podobné. Zajímalo by mě, jakým způsobem je při hodnocení kolokalizačních experimentů volena dráha pro odečty závislosti fluorescence na vzdálenosti (v levých horních panelech reprezentována bílou čarou). Přejde mi, že to je docela zatíženo chybou výběru. Je subcelulární lokalizace (lysozomy, částečně mitochondrie) ftalocyaninů a

jejich komplexů z hlediska PDT výhodná, nebo by bylo lepší, kdyby byla lokalizace například jenom v plazmatické membráně, tak jak je to cílem u návrhu vašich subPc?

9. Zpětně hodnoceno, byly problémy s internalizací komplexů Pc-CB[7] do buněk patrné už v kolokalizačních experimentech v tom smyslu, že by komplexy dávaly nižší intenzity fluorescence než samotné Pc?
10. Ve všech fotofyzikálních i buněčných experimentech byly komplexy Pc-CB[7] připravovány in situ, tj. přidavkem příslušného ekvivalentu CB. Nebylo by, obzvláště v případě experimentů na buňkách, spolehlivější metodou připravit komplexy předem, charakterizovat je, aby bylo zcela zřejmé, jestli je na ftalocyanin navázaná 1, 2, 3 nebo 4 jednotky CB? A pak teprve spekulovat, že např. molekulová hmotnost vzniklého komplexu či jeho hydrofilita je příliš vysoká pro vstup přes membránu? Byl by tento přístup prakticky realizovatelný?
11. Překvapilo mě, že v závěru kapitoly o subPc nezaznělo jasné konstatování, že látky 38 a 39, které mají adamantylový substituent napojen přes kyslíkový atom, netvoří komplexy s CB (protože nejsou kladně nabitě v oblasti, která by interagovala s ústím kavity CB). Dle mého čtení výsledků toto netvoření komplexů dokládají výsledky jak fotofyzikálních měření, tak měření log P. Nebo ta situace není takto jasná? Byly kyslíkové isostery připraveny jen pro porovnání, nebo se předpokládalo, že by se do CB mohly vázat?
12. Je možné nukleofilní substituce provádět již na hotovém ftalocyaninu (tj. obdobně, jak to popisujete u subPc? Šlo by takto přeměnit bromderivát 48H na původně zamýšlený Pc s osmi diethylamino substituenty?
13. Kvůli nesymetricky substituovaným prekurzorům jsou vaše vzniklé Pc, jak správně přiznáváte v komentáři i samotné publikaci, teoreticky směsí polohových izomerů. Pozorovali jste tyto izomery reálně (na základě čehokoliv), nebo byly jen předpokládány? Činila chemická nejednotnost problémy při snaze o publikování, nebo je to v této oblasti chemie běžně akceptované?

Výše uvedené připomínky nesnižují vysokou kvalitu předložené disertační práce, kterou tímto doporučuji k obhájení s následným udělením titulu Ph.D. v oboru Farmaceutické chemie.

V Hradci Králové,

20. března 2024

doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.