

Mgr. Miroslav Vařecha, Ph.D.

Mezinárodní centrum klinického výzkumu Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně
Pekařská 53
602 00 Brno

**Oponentský posudek disertační práce MUDr. RNDr. Martina Poly, MBA s
názvem
"Role kyslíku v účinnosti fotodynamické terapie na buněčných modelech
v přítomnosti senzitizerů"**

Disertační práce MUDr. RNDr. Martina Poly, MBA je zpracovaná stručně a výstižně o celkovém počtu 86 stran včetně přehledu použité literatury. V přehledu aktuálního stavu problematiky se doktorand zabývá účinky fotodynamické terapie na buněčné a systémové úrovni, přehledem první, druhé a třetí generace fotosenzitizerů a jejich využitím v preklinické a klinické praxi. Doktorandem získané experimentální výsledky jsou pak prezentovány na 17 stranách, kde doktorand úspěšně demonstruje způsob řešení vytyčených cílů předkládané práce: studium účinnosti fotodynamické terapie v závislosti na parciálním tlaku kyslíku a druhu fotosenzitizeru, ověření zvýšené produkce singletového kyslíku při vyšších koncentracích kyslíku a ověření zvýšeného terapeutického účinku PDT na vybrané buněčné nádorové linii vystavené vyššímu pO_2 . Největší pozornost soustředí na rozdílnost distribuce dvou senzitizerů $ZnTPPS_4$ a $ZnPcS_2$ v buněčných kulturách HeLa, odlišnost v produkci singletového kyslíku, ovlivnění mitochondriálního membránového potenciálu a buněčnou respiraci. Dosažené výsledky měření ukazují, že produkce singletového kyslíku ve fosfátovém pufru u vybraných senzitizerů se neliší při koncentracích kyslíku, které odpovídají tkáňové normoxii nebo 90-násobně vyšší koncentraci. Dalším pozorováním na buněčných liniích HeLa bylo zjištěno, že senzitizer $ZnPcS_2$ vykazuje vyšší afinitu k mitochondriím, kdežto $ZnTPPS_4$ lze ve zvýšené míře lokalizovat v lysosomech a také, že účinnost PDT, hodnocena pomocí MTT testu, závisí na parciálním tlaku kyslíku v atmosféře, ke které byly buňky vystaveny. V dusíkové atmosféře bylo dosaženo mnohem větší účinnosti PDT při použití senzitizeru $ZnPcS_2$, kdy buněčná viabilita HeLa buněk klesla až o 80 %, zatímco u senzitizeru $ZnTPPS_4$ dosahovala pouze 20 %. Právě vyšší afinitu senzitizeru $ZnPcS_2$ k mitochondriím a jeho inhibiční vliv na respirační řetězec považuje doktorand za příčinu menší závislosti v jeho účinnosti na koncentraci kyslíku.

Všechny prezentované výsledky považuji za hodnotné a jsou bezesporu přínosem k vědeckému poznání a mohou významně přispět při klinických aplikacích využívající PDT.

Po formální stránce mám k práci několik připomínek, které nesnižují její vědecký přínos:

1. V práci se objevuje několik nepřesností, překlepů a chybějící interpunkce, např. na str. 5 - oligomycin je uveden jako inhibitor ATP, str. 15 - deriváty tchipurinů (místo thiopurinů), str. 15 - „ Užití kyseliny 5-aminolevulové (ALA) se ukázalo jako důležitý .“, str. 45 - standartní odchylky, apod.
2. I když experimentální část byla zaměřena na úlohu kyslíku v PDT, tak úvodní kapitoly věnující se třetí generaci senzitizerů a nanotechnologii v PDT mohly být více rozepsány.
3. Na rozdíl od obrázků píšeme popisek k tabulce nad tabulkou (viz Tabulka 1 a 2).
4. Seznam použité literatury obsahuje 104 citací, z nichž pouze 15 z nich je mladších 5 let.

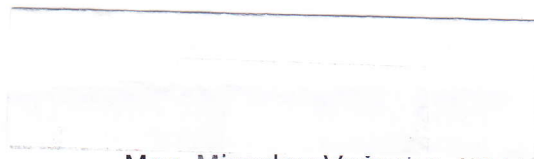
Dále mám k práci tyto následující dotazy:

1. Na str. 9 uvádíte: „Cytosolové enzymy jsou méně náchylné k poškození k PDT. Tato pozorování souvisí s velice krátkou životností singletního kyslíku ve vodném prostředí oproti lipidové vrstvě.“ Mohl byste zmínit, jaké jsou přibližně doby života singletového kyslíku ve vodném prostředí a v lipidech. Jak si vysvětlujete vyšší náchylnost k poškození ve spojitosti s rozdílnými dobami života singletového kyslíku. Jak se liší koeficienty difuze singletového kyslíku v těchto rozdílných prostředích a jak třeba samotná rychlost difuze může ovlivnit míru poškození?
2. Při porovnávání různých senzitizerů uvádíte nižší tkáňovou pronikavost světla kratších vlnových délek. Mohl byste alespoň přibližně kvantifikovat rozdíly v pronikavosti světla delších a kratších vlnových délek.
3. Při měření produkce singletového kyslíku ve fosfátovém pufru u senzitizerů ZnTPPS_4 a ZnPcS_2 jste nezměřil žádný významný rozdíl mezi vzorkem pufru s nízkou (0,4 mg/l) a vysokou (36 mg/l) hladinou kyslíku, avšak při měření produkce singletového kyslíku v HeLa buňkách vystavených dusíkové atmosféře byl u těchto senzitizerů změřen významný rozdíl v produkci singletového kyslíku. Čím si to vysvětlujete?

Závěr:

Po celkovém zhodnocení předložené disertační práce MUDr. RNDr. Martina Poly, MBA doporučuji přijetí této práce k obhajobě a dalšímu řízení. Rovněž doporučuji, aby byl MUDr. RNDr. Martinu Polovi, MBA po úspěšné obhajobě přiznán vědecký titul Ph.D.

V Brně dne 27. 1. 2023



Mgr. Miroslav Vařecha, Ph.D.





Posudek disertační práce MUDr. RNDr. Martina Poly:

Role kyslíku v účinnosti fotodynamické terapie na buněčných modelech v přítomnosti senzitizerů

Předložená disertační práce o 87 stranách je sepsána v českém jazyce a obsahuje 104 odkazů na aktuální vědecké zdroje, 26 obrázků a 2 tabulky. Grafická úroveň dokumentu odpovídá typickým požadavkům.

V úvodu práce jsou stručně popsány základní fyzikálně-chemické a biologické principy funkce fotodynamické terapie s důrazem na léčbu onkologických onemocnění. Další část podrobněji rozebírá jednotlivé generace fotosenzitizerů z pohledu syntézy, principu terapeutického účinku a nežádoucích účinků léčiva, vč. příkladů chemických vzorců¹ syntézy nebo typických zástupců jednotlivých generací² léčiv.

Cíl práce (str. 35) je zaměřen na studium účinnosti fotodynamické terapie v závislosti na parciálním tlaku kyslíku a druhu fotosenzitizeru. V této části jsou cíle stručně avšak jednoznačně definovány. Předchází jim statě z úvodních kapitol, které pojednávají o typech fotodynamické reakce a roli kyslíku při fotodynamické terapii. Avšak chybí mi zdůvodnění cílů práce ve srovnání se současným stavem poznání³, které by ozřejmilo a vysvětlilo přínos této práce.

V následujících částech práce⁴ jsou postupně představeny výsledky tří původních studií⁵, z nichž dvě jsou publikované v časopisech s IF (1,560 a 3,651). Citační ohlas těchto prací v době sepsání posudku byl 12 (WoS 8), což jasně naznačuje, že řešená problematika z oblasti fotodynamické terapie a tím i **téma disertační práce jsou velmi aktuální**. Pro dotaz na klíčová slova „Photodynamic Therapy“ v období od r. 2022 našel scholar.google.com přibližně 27 500 položek a PubMed.gov přibližně 3 440 položek.

Pan doktor velmi dobře zvládl metodické aspekty práce, jak prokázal ve popisovaných studiích. Experimenty byly postaveny způsobem vhodným pro získání odpovídajících dat, analýza využívala odpovídající statistické modely. Všechny **použité metody jsou v oblasti výzkumu PDT živé a vhodné** pro cíle, které byly zvoleny.

¹ Jako určitou výtku uvádím špatnou kvalitu a čitelnost indexů v chemických vzorcích (např. obr. 9 apod.). Pokud byly obrázky vyhotoveny autorem, měla být věnována větší péče jejich zpracování. Pokud se jedná o převzaté obrázky, chybí citace zdrojů.

² V kapitolách „Třetí generace fotosenzitizerů“ a „Nanotechnologie v PDT“, které jsou poměrně stručné v porovnání s kapitolami předchozími, mi chybí citace relevantních zdrojů obsahujících podrobnější údaje.

³ V porovnání s citovanými pracemi zabývajícími se též problematikou účinnosti PDT v souvislosti s mírou přítomnosti kyslíku – např. citace [49, 50, 51, 74, 75, 76, 88].

⁴ Mám výtku obecně k citacím v práci. Citace nejsou řazeny postupně dle výskytu, literární zdroj [51] jsem nedohledal, že by byl citován.

⁵ Sama práce, bohužel, necituje autorovy studie, z nichž informace čerpá a není tak na první pohled zřejmé, zda jde o výsledky již publikované (a tudíž již kvalitně recenzované) nebo úplně nové. Toto si čtenář musí dohledat sám. Citaci bych zde výrazně doporučil.

Experimentální část práce přináší nové poznatky o efektu fotodynamické terapie. Výsledky ukazují, že klíčovým prvkem pro efektivní PDT je volba vhodného fotosenzitizéru. Naznačují také, že vhodný fotosenzitizér by mohl efektivně využít i mechanismus typu I a tím se pravděpodobně vyrovnat s nízkými koncentracemi molekulárního kyslíku. **Výsledky jsou validní a představují významný krok ve výzkumu fotodynamické terapie.**

Závěr práce poněkud neobvykle kombinuje výsledky/závěry vlastních a cizích prací. Vzhledem k absenci citace vlastních prací se tak jeví nepřehledným, obzvláště, pokud na jedné straně uzavírá, že: „Zjištění z in vitro experimentů a experimentů na zvířatech naznačují, že současná aplikace HBO a PDT má silnější efekt než PDT.“ (bez citace) a zároveň dodává, že: „Naše měření však ukázala, že toto není nutné, pokud se PDT používá za normoxických podmínek, kdy hladina kyslíku je již dostatečná k vyvolání maximální produkce singletového kyslíku. Ukazuje se, že nižší dostupnost kyslíku může být kompenzována i delší interakcí excitovaného fotosenzitizéru s molekulou kyslíku, např. díky delší době života tripletového stavu fotosenzitizéru.“, což je poněkud v rozporu. Mnohem lépe je práce s jejími cíli i závěry shrnuta v kapitole „Souhrn“.

Dovoluji si položit následující otázky vztahující se k předložené práci:

- 1) Je známo z nějakých (aktuálních) rešeršních prací, zda po podání PDT převažuje pozorování imunostimulace či imunosuprese a případně v jakém poměru? Je z tohoto pohledu nějak výrazný rozdíl mezi typy senzitizerů, např. hydrofilní vs. lipofilní apod.?
- 2) Ve své práci uvádíte, že kombinace PDT s metodami zvyšujícími koncentraci molekulárního kyslíku nebude nezbytná „...pokud PDT využije mechanismus typu I, jak se to jeví pro fotosenzitizér $ZnPcS_2$.“ Pokročili jste nějak v tomto směru vlastním výzkumem, nebo jej připravujete, případně objevili se již nějaké studie tuto hypotézu podporující?
- 3) Uvedené experimentální činnosti vycházejí z prací publikovaných kolektivem autorů, můžete specifikovat, Váš příspěvek k výsledkům?

Předložená práce „Role kyslíku v účinnosti fotodynamické terapie na buněčných modelech v přítomnosti senzitizerů“ obsahuje původní, vědecky oponované a pro výzkum v oblasti PDT obvyklým způsobem publikované výsledky. Práce MUDr. RNDr. Martina Poly nese prvky tvůrčí činnosti a odpovídá VŠ zákonu č. 111/89 Sb., §47 odst. 4., proto ji doporučuji k obhajobě a v případě úspěšné obhajoby udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D.

V Hradci Králové
20. 1. 2023

doc. RNDr. Aleš Bezrouk, Ph.D.
Ústav lékařské biofyziky
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova