

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Jany Humpolíčkové „Application of Modern Fluorescence Techniques for Studies of Nano-organized Systems (Polymeric Micelles and Lipid Membranes).“

Předložená disertační práce má charakter komentovaného souboru již vyšlých vědeckých publikací. Práce je psána anglicky, a pokud mohu soudit, až na drobné překlepy dobrou angličtinou. Autorka v úvodu práce uvádí svůj seznam publikací, který obsahuje 10 impaktovaných publikací, přičemž na čtyřech z nich je J. Humpolíčková hlavní autorkou. Uvedené práce již prošly náročným recenzním řízením, některé z nich mají vysoký impaktní faktor. Již tento přehled publikační aktivity dokazuje odbornou úroveň zcela postačující na titul Ph.D. V příloze disertace jsou pak 4 články související úzce s tématem disertace, uveřejněné v impaktovaných časopisech (J. Phys. Chem. A, Langmuir, Biophysical Journal a Collection of Czech Chemical Society).

Obsáhlý komentář je rozdělen do čtyřech kapitol, zaměřených především na metodické otázky vlastního výzkumu autorky. Přehled citované literatury obsahuje 104 odkazů. Kapitoly se týkají modelového systému – blokových kopolymerních micel (block copolymer micelles), metody relaxace rozpouštědla a fluorescenční korelační spektroskopie ve třech dimenzích (tj. v roztocích) v aplikaci na polymerní micely a ve dvou dimenzích při aplikaci na výzkum buněčných membrán. Použité metody jsou velmi moderní a progresivní, umožňují mj. detailní pohled do podstaty a dynamiky Stokesova posuvu mezi absorpčním a fluorescenčním spektrem s využitím časově rozlišených emisních spekter (TRES) a umožňující mapovat difúzní jevy v heterogenních systémech (FCS).

Výklad je proveden zřetelně, srozumitelně a kondenzovaně, vystihuje podstatu metod a uvádí konkrétní aplikace.

Přínosné je mj. detailní vzájemné porovnání jednotlivých technik a vymezení jejich použití (např. porovnání QELS a FCS) a vysvětlení podstaty a použití metody z-skenu. Práce kromě zhodnocení metodik přináší nové výsledky ve výzkumu nanočásticových polymerních micel, především v pochopení procesů v micelární vrstvě na povrchu polymeru (zhodnocení stanovení molekulové hmotnosti micel a jejich hydrodynamického poloměru s využitím fluorescenční sondy), zachycení role molekul vody v solvataci polymerních řetězců micel (v systémech PS-PVP, PS-POE, PS-PVP-POE), zjištění, že micely jeví silnou tendenci agregovat při nízkém pH, interpretace mechanismu tvorby těchto agregátů apod. Důležitá je diskuse zákonitostí chování molekul fluorescenční sondy, konkrétně především ORB (oktadecylrhodamin B) (zhášení fluorescence, závislost na koncentraci).

Zdůrazněna je unikátnost a nezastupitelnost FCS při studiu biologických membrán, konkrétně při studiu jejich heterogenity a při důkazu přítomnosti heterogenních prvků (raftů, síťových struktur aj.). Studovány byly konkrétně jevy v plazmatických membránách oligodendrocytů.

K práci mám některé poznámky a dotazy.

Poznámky.

- 1) U citace číslo 70 (str. 54) chybí stránky.
- 2) Na obr. 6 (str. 32) má být zelená čára, v mém výtisku disertace není.
- 3) Pojem „Patman“ není psán jednotně, někdy je psán s malým, jindy s velkým počátečním písmenem P. V seznamu zkratk není pak tato zkratka vhodně umístěna (podobně DiD). V seznamu zkratk je ORB zřejmě octadecylrhodamine B (str. 5). Na straně 9 místo „1,4-dioaxane“ má být pravděpodobně „1,4-dioxane“.
- 4) Poznámky k angličtině: str. 28 místo „emersion“ má být zřejmě „immersion“, místo „than“ má být „then“.

- 5) Do výkladu matematické podstaty FCS se dostaly některé překlepy a nejasnosti, např. strana 30: - ω_0 není pološířka geometrického svazku (pološířka je $\omega_0 \cdot 2 \cdot (\ln 2)^{0.5}$)
- ve vzorcích (21) a (23) má být $G(\tau)$ místo $G(t)$.
- výraz $\delta(\sigma q C(r,t))$ platí pouze pro lineární aproximaci Lambert-Beerova zákona, tj. pro velmi nízké optické hustoty vzorku.
- ve vyjádření $\delta F(t)$ na straně 30 by měl být integrál přes prostorové souřadnice.
- 6) Na obr. 6 (strana 32) a obr. 7 (strana 34) je zřejmě na svislé ose veličina N/N_∞ .

Dotazy.

- 1) Strana 28. Skutečně otvor ve clonce (pinhole) konfokálního mikroskopu odstraňuje všechny fotony, které nepochází z ohniskové roviny objektivu? Jak pak chápat pojem „waist“ (např. str.39)?
- 2) Jaké jsou jednotky veličiny R_H uvedené na obrázku 9 (strana 36)?
- 3) Emisní spektra (strana 25) jsou uváděna v závislosti na energetických jednotkách (cm^{-1}). Jaký je názor autorky na obvyklé uvádění emisních spekter v závislosti na vlnové délce (např. v nm)?
- 4) Jaký je rozdíl mezi „mass-weighted“ a „number-weighted“ molekulovou hmotností, případně „intensity weighted“ (str. 37), lze tyto pojmy vyjádřit matematicky?
- 5) Neprojevuje se při využití fluorescenčních sond také jejich difúze v rámci micelární vrstvy?
- 6) Je nutné brát také v potaz problém reabsorpce fluorescence při vašich měřeních ?
- 7) Prosím o vysvětlení poslední věty části 2.2.2. (str. 24). Co znamená „the amount of unresolved relaxation“?
- 8) Jakou roli hraje veličina δ_0 ve vzorcích (10) a (11) (str. 17)?
- 9) Dotaz k článku Langmuir 2003. Jsou uváděny rozměry micel zjištěné pomocí AFM ve vertikálním (20 nm) a horizontálním směru (100 nm). Byla vzata v úvahu skutečnost, že v horizontálním směru mají AFM mikroskopy podstatně větší rozlišovací mez než ve vertikálním směru?
- 10) V člancích je zmiňována vysoká intenzita laserového svazku. Nevyvolává tento svazek nevratné poškození molekul fluoroforu (např. fotooxidaci) podobně jako u metody FRAP?

Závěrem mohu konstatovat, že předložená práce přináší velmi užitečné zhodnocení využitelnosti moderních metod relaxace rozpouštědla a fluorescenční korelační spektroskopie při studiu polymerních micel a řadu nových a perspektivních výsledků v oblasti modelů heterogenních systémů, dokazuje přehled a porozumění problematice. Autorka prokázala předpoklady pro samostatnou vědeckou práci.

Práce splňuje všechny náležitosti v souladu se zákonem 111/1998 Sb. a jeho novelizací. Doporučuji ji proto práci k obhajobě a Janě Humpolíčkové titul Ph.D. v oboru fyzikální chemie.