

**Oponentský posudek na magisterskou práci Tomáše Fessla:
„Sestavení a zprovoznění aparatury pro měření fluorescenčních spekter
jednotlivých molekul“.**

Předložená magisterská práce Tomáše Fessla je věnována mimořádně aktuálnímu a zajímavému tématu – experimentálnímu studiu jednotlivých molekul metodami emisní spektroskopie. Pozůstává ze čtyř hlavních částí a závěru.

V poměrně rozsáhlém úvodu je popisována problematika spektroskopie jednotlivých molekul a to se zvláštním zřetelem na experimentální podmínky spektroskopických měření. Postupně jsou rozebírány obecné faktory, které limitují podobná měření, zejména šum a rušivý signál pozadí.

Značná pozornost je věnována nejrůznějším technikám spektroskopických měření na jednotlivých molekulách. Je vysvětlen princip činnosti lavinových fotodiod, moderních dvojdimenzionálních řádkových CCD detektorů světla s kanálovými zesilovači fotoelektronů, jakož i křemíkových CCD kamer se znásobeným výtěžkem čipu. Dále jsou postupně rozebírány různé mikroskopické techniky, jež byly v oblasti spektroskopie jednotlivých molekul již úspěšně použity. Jedná se především o skanovací metody využívající výhod konfokální mikroskopie včetně buzení fluorescence miniaturním optickým vláknem v režimu mikroskopie blízkého pole. Dalším experimentálním přístupem je mikroskopie širokého pole, jež pro zobrazování jednotlivých molekul využívá povrchové buzení evanescentní vlnou v epifluorescenci nebo techniky spektroskopie úplného vnitřního odrazu (TIR).

Velmi podrobné informace o prostorové orientaci molekul lze získat pomocí měření polarizované luminiscence. Buzení luminiscence polarizovaným světlem v režimu spektroskopie úplného odrazu je vhodné ke studiu geometrie molekul. Naopak sledování změn ve spektrálním složení emise jednotlivých molekul poskytuje informaci o nejbližším okolí dané molekuly. Účinnou metodou pro stanovování vzájemných molekulárních vzdáleností donoru a akceptoru jakož i pro sledování konformačních změn v biomakromolekulách je Försterův fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET). Závěr této úvodní části je věnován výhodám dvoufotonového buzení luminiscence a časově závislým dynamickým studiím, založeným na měření dob dohasínání fluorescence.

Celá tato úvodní část poskytuje řadu cenných informací o složité moderní spektroskopické technice ke sledování jednotlivých molekul, a to včetně částečného rozboru některých inherentních experimentálních obtíží. Ze zpracování je jasně patrné, že se diplomantovi podařilo proniknout do této experimentálně obtížné problematiky.

Experimentální část práce popisuje jednak použité materiály i měřicí techniky. Pro měření byla sestavena aparatura s He-Cd laserem, invertovaným optickým mikroskopem se zařízením pro spektroskopii totálního vnitřního odrazu, zobrazujícím spektrografem a moderními detektory světla. Spektrograf byl nejprve kalibrován pomocí neonové a argonové kalibrační spektrální lampy.

Vlastní měření byla prováděna na vzorcích di-methyl-oxa-karbocyaninu (DIOC), dále na chlorofylu *a* a rovněž na složitějším biologickém preparátu – komplexu fotosystému I z thylakoidní membrány izolované z *Prochlorotrix hollandica*.

Významným výsledkem této práce je skutečnost, že se na dané aparatuře podařilo zachytit velmi dobře rozlišená emisní spektra jednotlivých molekul DIOC, což je názorně dokumentováno na obrázcích 16–23 na straně 38–40. Tato skutečnost svědčí o tom, že se diplomantovi podařilo splnit stanovený cíl práce.

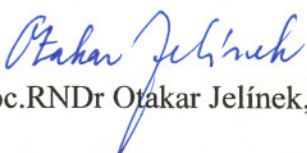
V případě chlorofylu *a* se bohužel zatím nepodařilo zachytit jednotlivé molekuly jako v komplexu fotosystému I, jak je ukázáno na obrázku 30 na str.43.

K práci mám následující připomínky:

Domnívám se, že tak mimořádně zajímavé tématice by mělo odpovídat i adekvátně pečlivé zpracování. Formální stránce práce měla být dle mého soudu věnována větší pozornost. Také stylizace jsou místy dosti neobratné. Za největší nedostatek považuji tu skutečnost, že v práci nejsou číslovány matematické vztahy a rovněž to, že v textu často chybí popis používaných symbolů. Pokládám za zbytečné oddělovat pomlčkou složeniny jako dvou-fotonový, dvou-hladinový a pod., jak se to vyskytuje v celé práci. I když se to v odborné literatuře často vyskytuje, není správný tvar detekovat ale detegovat, jak jsem sám před čase ověřil dotazem v Ústavu pro jazyk český. Na str.8 je *h μ* místo správného *h ν* . V práci je též dle mého soudu zbytečné množství anglikanismů jako na str.5 „a/nebo“, str.16 „designovaného“. Na str.9 chybí paginace a na str.10 by mělo být fosforescenční stínítko místo fosforové. Domnívám se, že v přejatých slovech by se mělo přihlížet spíše k jejich původnímu pravopisu – tedy skanovat místo skenovat. Také úvodní seznam použitých zkratk obsahuje řadu nepřesností: CCD je nábojově vázaný prvek, FWHM je plná šířka v polovině maxima – proč genitiv?, OD není neutrální (šedý) filtr, ale jeho charakteristika optická hustota, PMT je dle mé zkušenosti zkratka pro běžný fotonásobič, pro mikrokanálkový fotonásobič bych volil MCPMT, TIR je zkratka pro totální vnitřní odraz.

Přes uvedené nedostatky se domnívám, že tato práce plně dokumentuje, že Tomáš Fessl zvládl obtížnou experimentální techniku v jedné z nejmodernějších oblastí optické spektroskopie. Aktivně se podílel na konstrukci unikátní aparatury a také se mu podařilo získat dobře rozlišitelné optické signály od jednotlivých molekul. Proto doporučuji tuto práci přijmout k obhajobě. Nedomnívám se však, že by mohla být vzhledem k řadě uvedených formálních nedostatků klasifikována nejvyšším stupněm.

V Praze dne 10.května 2006


Doc.RNDr Otakar Jelínek,CSc.

Oponentský posudek

magisterské práce Tomáše Fessla:

„Sestavení a zprovoznění aparatury pro měření fluorescenčních spekter jednotlivých molekul“

Předložená magisterská práce popisuje *budování aparatury pro měření fluorescenčních spekter jednotlivých molekul, její testování a první sady experimentálních výsledků.*

Jelikož jsem velmi dobře obeznámen se vznikem této aparatury v laboratoři doc. F. Váchy na Ústavu fyzikální biologie JČU a Ústavu molekulární biologie rostlin AVČR, musím předem svého hodnocení říci, že se jedná o *unikátní zařízení*, které nemá obdobu v České republice (a ve světě také není mnoho srovnatelných zařízení). Jedinečnost této aparatury je především v extrémně velké citlivosti, nízkém šumu a vynikajících zobrazovacích vlastnostech zároveň s výborným spektrálním rozlišením - v budoucnu navíc kombinovaném s fluorescenční korelační detekcí. Rozjezd každého takového unikátního zařízení je spojen s mnoha drobnými i většími, předvídatelnými i neočekávanými potížemi a úskalími. Jejich postupné překonávání, budování know-how a vytváření standardizovaných experimentálních postupů vyžaduje soustředěné úsilí. V tomto případě se o rozjezdovou fázi budování zasloužil zejména dr. Adamec a významně přispěl i Tomáš Fessler, který tím prokázal schopnost soustavné vědecké práce.

Magisterská práce Tomáše Fessla podává nejprve přehled mladého perspektivního oboru spektroskopie jednotlivých molekul (SMS). Jsou zde nastíněny základní principy a používané experimentální postupy s příklady z literatury. Experimentální část podává popis aparatury a její kalibrace a dále jsou prezentovány výsledky měření barviva DIOC, chlorofylu-a, a komplexu fotosystému I.

Celkově je práce přehledná, dobře členěná, ale jazyková a stylistická stránka má daleko k dokonalosti. Z této formální stránky bych zejména vytknul:

- zbytečné (a někdy nepřesné) používání cizích slov, např. objektivy navržené pro určité pozorování jsou uvedeny jako „objektivy ... designované pro ...“
- nepřesné používání některých termínů (laserová barva místo barvivo, fosforové stínítko místo fosforescenčního atd.), zkratk (např. u totální *vnitřní* reflexe TIR zapomináte uvádět vnitřní, OD znamená optickou hustotu) a jednotek (stupeň Kelvína se píše jen K, nikoliv °K)

- otrocký překlad některých anglických termínů, které pak působí až komicky, např. frame-transfer kamery (kamery s přesunem snímku) jsou uváděny jako „kamery s rámcovým posunem“ (Pokud není jasný ustálený český ekvivalent, je snad lépe nechat tyto názvy v originále)
- nešikovné usprádaní vět a zvolené formulace někdy vedou až k nesprávným výroky, i když poučený čtenář si domyslí, co chtěl autor říci
- často chybí citace u převzatých obrázků a u rovnic, které jsou předloženy bez odvození.

Obsahové stránce předložené práce bych vytknul zejména toto:

- popis experimentální aparatury měl být podrobnější. Například chybí zmínka o tom, že spektrometr obsahuje v sobě kromě dvou mřížek také zrcadlo a vůbec chybí popis zobrazovací spektroskopie. Některé části aparatury mají chybný název nebo označení původu (křemenný hranol pro TIR je vyroben v optických dílnách MFF UK a ne v Turnově atd.).
- popis kalibrace aparatury se omezuje jen na spektrální kalibraci a nezmiňuje se o prostorové kalibraci a o měření a korekci spektrální odezvy systému.
- diskuse a závěr jsou příliš stručné, postrádám třeba porovnání s podobnými výsledky v literatuře a více zamyšlení nad významem získaných výsledků a budoucím směřováním.


Během obhajoby bych požádal o zodpovězení těchto otázek:

- ◆ *Princip činnosti zesilované CCD kamery (I-CCD) je na str. 13 popsán velmi zmateně. Vysvětlete jaké hlavní součásti tato kamera má a na jakých jevech je založena jejich činnost.*
- ◆ *Velmi významným a jedinečným jevem při pozorování jednotlivých kvantových zdrojů světla (molekul, nanokrystalů) je *intermitence*. Ve své práci se o ní příliš nezmiňujete. Vysvětlete v čem intermitence spočívá a zda jste ji pozoroval při svých experimentech.*
- ◆ *V aparatuře je použit zobrazovací (imaging) spektrometr Triax 320. Čím se liší od klasických spektrometrů a monochromátorů? Jaké jsou principy a výhody zobrazovací spektroskopie?*

- ◆ Poslední otázka je spíše diskusní. Myslíte, že by se dalo uvažovat i o absolutní kalibraci aparatury (nebo alespoň určitých měření) s cílem určit kvantovou účinnost emise pozorovaných objektů?

Celkově lze konstatovat, že magisterská práce Tomáše Fessla splňuje požadavky kladené na diplomové práce. Diplomant prokázal schopnost podílet se na zrodu nových experimentálních technik, získat první systematická data a zpracovat je. Jelikož ovšem formální a obsahová stránka má značné nedostatky, navrhuji hodnocení diplomové práce známkou velmi dobře (2).

V Praze, dne 17. května 2006



.....
Doc. RNDr. Jan Valenta, PhD.

KCHFO, MFF UK v Praze