

## Oponentský posudek

### dizertační práce Ing. Jany Koubkové „Příprava monodisperzních polymerních mikročástic s povrchem omezujícím nespecifickou adsorpci bílkovin“

Téma dizertační práce J. Koubkové považuji za aktuální. Problematice přípravy polymerních částic s definovanými vlastnostmi a jejich (potenciální) využitelnosti je i v současnosti na mezinárodní úrovni věnována nezanedbatelná pozornost. Využití novějších poznatků z oblasti makromolekulární chemie pak navíc přináší další možnosti ovlivnění charakteru finálních produktů. Pracoviště, na kterém J. Koubková vypracovávala svou dizertaci, má pro výzkumné aktivity v této oblasti velmi dobré předpoklady.

Přehled o současném stavu problematiky (teoretická část) je sepsán srozumitelně a v rozsahu odpovídajícím charakteru práce. Cíle práce jsou formulovány poměrně jednoznačně a skutečně se autorce staly vodítkem v další práci. Popis uskutečněných experimentů většinou obsahuje dostatek údajů proto, aby je bylo možno nezávisle opakovat. Kapitola „Výsledky a diskuze“ zahrnuje podstatná zjištění získaná v průběhu vypracovávání dizertace, se snahou o jejich konfrontaci s již popsányými poznatky v této oblasti. Data jsou na příslušných místech vhodně prezentována v tabelární nebo grafické podobě, či podpořena záznamy použitých instrumentálních technik. Seznam použité literatury sahá až do roku 2014, tj. roku předložení práce. Četně používané zkratky a symboly jsou shrnuty na začátku práce. Práce má odpovídající formální úroveň. Je sepsána bez většího počtu překlepů (ale např. na str. 60 i jinde v textu „terciální...“). Dále nebyly vzaty v potaz některé v současnosti doporučované odborné termíny (např. „inkrement relativní viskozity“ namísto „specifická viskozita“ a „reverzibilně deaktivovaná“ namísto „pseudoživá“ radikálová polymerizace (viz níže), pravidla pravopisu (difuzní a nikoli difúzní) a označení jednotky času (h a nikoli hod.).

Požaduji, aby autorka práce v průběhu obhajoby reagovala na moje následující připomínky:  
(1) Dle doporučení IUPAC (Pure and Applied Chemistry **82**, 483 (2009)) je upřednostňováno používání termínu „reverzibilně deaktivovaná“ radikálová polymerizace namísto „živá/pseudoživá“ nebo „řízená“ radikálová polymerizace. Uveďte své důvody pro preferenci termínu „pseudoživá...“.

(teoretická část, str. 29 a dále)

(2) Způsob stanovení zastoupení oxiranových skupin v poly(glycidyl-methakrylátu) využitím metody infračervené spektroskopie není z textu úplně zřejmý. Žádám proto o bližší vysvětlení.

(experimentální část, str. 47, výsledky a diskuze, str. 60 a dále)

(3) Do jaké míry může podpořit požadavek modifikace částic především na jejich povrchu obměna dalších podmínek experimentů kromě poměru reakčních komponent?

(výsledky a diskuze, str. 64 a dále)

(4) Pro potenciální rozšíření provedených laboratorních experimentů do většího měřítka je významná jejich reprodukovatelnost. Jaké v tomto ohledu autorka nabyla poznatky?

(5) U chemických látek hraje důležitou roli jejich působení na živé organizmy. Do jaké míry byl tento aspekt zohledněn v této práci?

Uvedené poznámky a námitky neomezují platnost autorčiných výsledků. Organizací experimentů, jejich provedením a formulací závěrů autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Dizertační práci Ing. Jany Koubkové proto doporučuji k obhajobě.



prof. Ing. Petr Sysel, CSc., EurChem

Prof. Ing. Ivo Šafařík, DrSc.

Oddělení nanobiotechnologie

Ústav nanobiologie a strukturní biologie CVGZ AV ČR, v.v.i.

České Budějovice

**Posudek na disertační práci Ing. Jany Koubkové**

**„Příprava monodisperzních polymerních mikročástic s povrchem omezujícím  
nespecifickou adsorpci bílkovin“,**

*vypracovanou na Fakultě chemicko-technologické University v Pardubicích a na Ústavu  
makromolekulární chemie AVČR, v.v.i. v Praze*

Polymerní nano- a mikročástice jsou velmi intenzivně studované materiály využitelné v nejrůznějších oblastech výzkumu a aplikací. Velice zajímavá je možnost jejich využití v různých oblastech biovědy, biotechnologií a environmentálních technologií, včetně různých oborů medicíny. Předložená disertační práce je zaměřena na reprodukovatelnou přípravu monodisperzních mikrometrových polymerních částic s povrchem modifikovaným polymerním zwitteriontem omezujícím nespecifickou adsorpci bílkovin. Tyto částice mnohou najít uplatnění v celé řadě separačních procesů biologicky aktivních látek z reálných roztoků.

Oponovaná disertační práce má klasickou strukturu. Práce v úvodní části poskytuje užitečnou a přehlednou obecnou informaci o polymerizačních technikách pro přípravu mikročástic, o přípravě magnetických polymerních mikročástic, o modifikaci povrchu polymerních mikročástic, a o metodách snižujících nespecifickou adsorpci bílkovin. Dále pokračuje poměrně detailní experimentální částí. Výsledky a diskuze jsou zaměřeny na detailní studium a optimalizaci přípravy polymerních mikročástic za různých podmínek. Následující část výzkumu se zabývala studiem funkcionalizace povrchu mikročástic přenosovým činidlem a studiem nespecifické adsorpce bílkovin. Výsledková část je podpořena velkým množstvím fotografií, grafů a tabulek.

Je zřejmé, že disertantka v průběhu řešení PhD nabyла značné zkušenosti v oblasti polymerních syntéz a modifikace vytvořených mikročástic. Práce je dobře srozumitelná a množství překlepů a dalších faktických nepřesností je malé. Ukazuje zároveň, že disertantka

vykonala v průběhu PhD studia velké množství experimentální práce, které bylo i adekvátním způsobem využito ve 2 vědeckých publikacích.

K předložené disertační práci mám následující připomínky a poznámky:

- Na str. 26 konstatujete, že příprava částic magnetických oxidů železa je známa od 60. let minulého století. Toto tvrzení je zavádějící, jaký specifický magnetický materiál byl připraven podle citace 57?
- Na straně 26 zmiňujete výborné magnetické vlastnosti feritů, nejedná se však o oxidy kobaltu, mědi či niklu. Co termín ferit ve skutečnosti znamená?
- Str. 42, co znamená termín „molekulový vylučovací chromatograf“?
- Str. 48, pro stanovení bílkovin používáte UV spektroskopii, jakou podmínku musíte splnit, aby měření bylo reprodukovatelné? Jaké jiné metody pro stanovení proteinů můžete použít?
- Str. 89, obrázek má mít číslo 41
- Při studiu nespecifické adsorpce bílkovin byl použit hovězí sérový albumin jako modelový protein. Jakým způsobem by se chovaly proteiny s extrémními hodnotami isoelektrického bodu, např. pepsin nebo lysozym?

Na závěr mohu konstatovat že předložená disertační práce Ing. Koubkové je kvalitní a odpovídá všem kritériím na disertační práce dle § 47, odst. 4, zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách. Disertantka prokázala schopnost samostatné vědecké práce, což je dokumentováno i příslušnou publikační aktivitou. **Vzhledem ke splnění všech formálních i odborných podmínek doporučuji přijmout práci k obhajobě.**

České Budějovice, 12. 4. 2015



## **Oponentní posudek disertační práce Ing. Jany Koubkové na téma „Příprava monodisperzních polymerních mikročástic s povrchem omezujícím nespécifickou adsorpci bílkovin“**

Předložená disertační práce se zabývá vývojem monodisperzních polymerních částic s modifikovaným povrchem omezujícím nespécifickou adsorpci bílkovin. Studován byl vliv modifikace na konečné vlastnosti. Velikost částic se pohybovala v rozmezí 0,5 – 5,5  $\mu\text{m}$ . Připravované částice byly na bázi glycidyl-methakrylátu s využitím disperzní techniky polymerace a následnou modifikací povrchu.

Z výše uvedeného výčtu je patrné, že se jedná o práci velmi rozsáhlou, náročnou na provádění experimentů i následnou interpretaci shromážděných dat. Výsledky byly několikrát publikovány v renomovaných časopisech a prezentovány na odborných konferencích, což potvrzuje aktuálnost problematiky i zodpovědné zpracování a presentaci shromážděných výsledků.

Práce velmi podrobně zpracovává optimalizační postupy při přípravě povrchově upravených polymerních mikročástic, které mohou nalézt uplatnění v různých farmaceutických, veterinárních aplikacích, případně i využití v humánní medicíně.

Je tedy bezpochyby velkou zásluhou této práce, že prostřednictvím jednoznačných závěrů vnáší nové poznatky do tohoto směru polymerní chemie. Vlastní práce má typické uspořádání požadované pro tento typ publikací a je logicky dělena do obvyklých částí počínaje úvodem, teoretickým přehledem, experimentální částí, zakončena diskusí a závěrem.

Po obsahové stránce nemám k práci zásadních připomínek. Mé poznámky a dotazy se týkají spíše formálního provedení. Věřím, že tyto nejasnosti budou během obhajoby vyjasněny:

1. Na straně **26** se píše, že magnetické částice nesmí nespécificky interagovat s látkami přítomnými v reálných prostředích. V čem se liší spécifická a nespécifická interakce?
2. Na straně **27** je zmíněno, že jsou roztoky železnatých a železitých solí „nasáty“ do porézní struktury. Jaká fyzikální síla žene toto „nasávání“.
3. Na straně **34** je uvedeno, že volba přenosového činidla závisí na typu monomeru. Jak to s typem monomeru souvisí, je to dáno jeho reaktivitou nebo chemickou strukturou?
4. Na straně **35** je napsáno, že bylo použito „přichycení skupinou R“. Lepší by bylo říci „zakotvení pomocí skupiny R“.

5. Na straně 37 je popsáno, že pomocí TEM na řezu částic je možno získat informaci o distribuci anorganického plniva v částicích. Je tím myšlena distribuce velikostí částic plniva nebo jejich umístění uvnitř, či vně částice?
6. Na straně 42 je popsán sérový hovězí albumin (BSA) s molekulovou hmotností  $M_w = 68\ 000$ . Jedná se o standardní typ albuminu? Proč byl vybrán právě tento?
7. Na straně 43 je popsáno stanovení oxiranových skupin v částicích polymeru prostřednictvím FTIR spektroskopie. Nepochybně se jednalo o kvantitativní analýzu. Jakým způsobem probíhala tato kvantifikace? Byly užívány nějaké kalibrační standardy?
8. Na straně 45 je popsána příprava dithiobenzoové kyseliny podle literárního odkazu [106]. Jednalo se opravdu o „Thermal decomposition of cumyl dithiobenzoate“?
9. Na straně 47 je napsáno, že obsah polymeru na částicích byl stanoven z analýzy dusíku. V čem spočívala tato „analýza dusíku“? O čem vypovídala?
10. Na straně 48 je popisována „Molekulová vylučovací chromatografie“. I když pro gelovou permeační chromatografii neexistuje jednoznačné označení, zdá se mi, že molekulová vylučovací chromatografie není příliš výstižným popisem separace.
11. Co znamená slovo „supernatant“ na straně 48?
12. Na straně 50 je na 4. řádku shora zmíněna „jednotnější velikost“ zárodků z obrázku číslo 10? Byla tím myšlena monodisperzita?
13. Na straně 57 se diskutují různé druhy iniciátorů a u BPO je zmíněno, že jeho použití vedlo ke vzniku agregátů. Bylo to v důsledku odlišných rozpustností nebo vlivem reaktivity tohoto iniciátoru?
14. Na straně 60 je popisován vliv reakčního média na obsah oxiranových skupin. Jednak bych nehovořil o „přeživších“ skupinách, ale o zachovaných, či nemodifikovaných skupinách a rovněž se chci zeptat, zdali tato FTIR charakterizace byla v práci prováděna nebo se jedná pouze o literární citaci [38].
15. Na straně 61 se na prvním řádku asi myslel reagující monomer, spíše než „reagovaný“ monomer.
16. Jakým způsobem byla vypočtena konverze oxiranových skupin (34%) na straně 63?
17. Na straně 69 se píše, že obsah dusíku v modifikovaných PGMA-PMPDSAH částicích byl spočítán. Byl též proveden pokus o jeho stanovení? Porovnání teoretického výpočtu s analytickým stanovením by bylo přínosné.
18. Na straně 71 je na konci odstavce řečeno, že měření agregace částic nebylo přesné v důsledku obtížného stanovení obrysů. Mohl za to program Atlas, nebo něco jiného?

19. Na straně 73 je popsán poměr DTBA/ACVA jako konstantní 24 mol/mol. Chápu dobře, že se myslí 24 molů DTBA na 1 mol ACVA?
20. Na straně 75 je na prvním řádku zmíněno „přichycení CTA“. Tento populárně naučný výraz je v disertační práci nevhodný. Asi se myslelo zakotvení na povrch?
21. Na straně 81 je popisována SEC chromatografie a neúspěch analýzy v důsledku přítomnosti solí. Co to zapříčinilo. Pokud se užívala hmotnostní spektroskopie, mohla to být špatná ionizace? Nebo to bylo něco jiného? V přílohách nejsou žádné záznamy GPC analýz.
22. Na straně 86 se píše, že se částice DTBA slepily. Slovo slepily, není v tomto případě příliš vhodné.
23. Na straně 89 je zmíněno, že hydrofobní povrch „denaturuje“ molekuly proteinů. V čem spočívá toto znehodnocení, či znečištění.
24. V závěru na straně 90 je zmíněno, že v současnosti se pro modifikaci povrchů polymerních mikročástic nejčastěji užívá poly-ethylenglykol. V čem spočívá jeho obliba?
25. Na straně 91 se konstatuje, že pro vysokomolekulární PAA (Mw 750k) nebyly nalezeny podmínky pro vznik monodisperzních částic. Mezi Mw 230k a 750k je poměrně velký rozdíl, který by v budoucnu mohl vést k dohledání přesné hranice, kde monodisperzní částice ještě vznikají a kde už ne.

Závěrem chci konstatovat, že práce je dostatečně kvalitní a posouvá kupředu naše poznání v dané oblasti. Přínosné bude nepochybně využití jejich výsledků v **chemickotechnologické praxi**. Tímto doporučuji tuto práci bez dalších připomínek přijmout k obhajobě.



V Pardubicích 27.4. 2015

Ing. Martin Kaška Ph.D.