



Warszawa, 1 września 2015

dr hab. Maciej Mazur
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1
02-093 Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Gabrieli Kani, pod tytułem
"Biokompatybilne, superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza do
zastosowań biomedycznych"**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Gabrieli Kani pod tytułem "Biokompatybilne, superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza do zastosowań biomedycznych" została zrealizowana w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Marii Nowakowskiej.

Praca dotyczy otrzymywania i charakterystyki eksperymentalnej superparamagnetycznych nanocząstek z tlenku żelaza oraz ich wykorzystania do celów diagnostycznych, w szczególności w metodzie MRI oraz obrazowaniu fluorescencji. Zastosowanie nanomateriałów w medycynie jest niezwykle szybko rozwijaną dziedziną nauki. Nanomateriały wykorzystywane są jako nośniki leków, materiały do regeneracji tkanek oraz środki poprawiające kontrast w trójwymiarowych technikach obrazowania takich jak MRI, CT, SPECT i PET. Tym samym tematyka pracy doktorskiej mgr Kani jest niezwykle ważna, aktualna i posiada bardzo istotny wymiar aplikacyjny.

Rozprawa liczy 121 stron i składa się z części literaturowej, w której omówiony został aktualny stan wiedzy w zakresie tematyki poruszanej w pracy oraz części badawczej, gdzie zaprezentowane zostały oryginalne wyniki badawcze Doktorantki.

Część literaturowa jest dość zwięzła i zajmuje 20 stron. Jest ona podzielona na dwa główne rozdziały: krótszy dotyczący obrazowania metodą MRI oraz dłuższy dotyczący otrzymywania, właściwości i zastosowań nanocząstek superparamagnetycznych.

W rozdziale omawiającym metodę MRI Autorka podaje podstawowe informacje dotyczące tej metody. W szczególności omawia możliwości obrazowania poszczególnych narządów w ciele człowieka oraz zalety i wady metody. Następnie dyskutuje, dlaczego w obrazowaniu MRI stosuje się środki kontrastujące. Omówienie to jest nieco skrótowo potraktowane - większość informacji zawarta jest podpisie do Rys. 1.

W kolejnych podrozdziałach Autorka opisuje rodzaje stosowanych środków kontrastujących, dzieląc je na pozytywne i negatywne. Podaje informacje, że pozytywne środki kontrastujące skracają czasy relaksacji protonów T_1 , przytacza przykłady związków spełniających ten warunek, w szczególności omawia zalety i wady stosowania związków gadolinu, w tym możliwość występowania powikłań, takich jak nefrogenne włóknienie układowe. Omawiając negatywne środki kontrastujące Autorka wskazuje, że ich cechą charakterystyczną jest skracanie czasów relaksacji T_2 , podaje przykłady związków znajdujących zastosowanie do ich wytwarzania oraz przykłady produktów komercyjnych. Autorka podkreśla też, że wadą komercyjnych produktów, takich jak nanocząstki tlenku żelaza modyfikowane dekstranem, jest agregacja rdzeni tlenkowych, gdzie "w jednej nanocząstce rozmiarów ok. 150 nm (średnica hydrodynamiczna) znajduje się kilka rdzeni wielkości 5 nm oraz duża ilość polimeru scalająca je w jeden klaster" (str. 31, podpis do Rys. 2). Uwaga jest zapewne słuszna, problem w tym, że w ramach realizacji swojej pracy doktorskiej mgr Kania otrzymała bardzo podobne struktury, gdzie nanocząstki tworzą agregaty połączone w klaster materiałem polimerowym (str. 63). Na czym w takim razie polega przewaga otrzymanego materiału?

Drugi rozdział części literaturowej dotyczy kolejno ogólnej charakterystyki nanocząstek z tlenków żelaza, metod otrzymywania, metod stabilizacji nanocząstek i ich zastosowań medycznych (w tym zastosowań tzw. nanocząstek wielofunkcyjnych).

Autorka podaje rodzaje materiałów tlenkowych z jakich najczęściej wytwarzane są nanocząstki magnetyczne oraz opisuje zjawisko superparamagnetyzmu. Opis jest w zasadzie poprawny. Szkoda, że Autorka nie wspomniała, co dzieje się z cząstkami superparamagnetycznymi poniżej temperatury blokowania.

W podrozdziale 2.1, Doktorantka podaje metody otrzymywania nanocząstek magnetycznych. Omówienie rozpoczyna od nanocząstek otrzymywanych w wyniku izolacji z bakterii z rodzaju *Magnetospirillum*. Następnie wymienia szereg preparatywnych metod chemicznych i fizycznych oraz prowadzi dyskusję nad zaletami i wadami wybranych w nich. Szerszy opis, umieszczony jest na końcu rozdziału i dotyczy omówionej na przykładzie magnetytu metody współstrącania z roztworów wodnych,. W ocenie recenzenta rozdział 2.1 jest potraktowany zbyt skrótowo. Dlaczego na początku (i dość wyczerpująco) omawiana jest izolacja z

mikroorganizmów, a najistotniejsza z punktu widzenia części badawczej metoda współstrącania na samym końcu (i to też w wersji mocno lakonicznej). Sądę też, należałoby czytelnikowi przynajmniej w skrócie przybliżyć na czym polegają pozostałe metody otrzymywania nanocząstek.

Kolejny podrozdział (2.2) omawia metody stabilizacji nanocząstek superparamagnetycznych. Autorka dzieli rodzaje stabilizacji nanokoloidów na elektrostatyczne oraz steryczne, a same stabilizatory na nieorganiczne i organiczne, omawiając bardziej szczegółowo w tym kontekście chitozan i jego pochodne. Dyskusyjne jest umieszczenie w tym rozdziale informacji o magnetosomach oraz magnetycznych polimerosomach. W ocenie recenzenta struktury takie zasługują raczej na osobny rozdział.

Następny podrozdział (2.3) traktuje o zastosowaniach nanocząstek superparamagnetycznych. Doktorantka opisuje warunki jakie powinny spełniać nanocząstki, aby mogły znaleźć zastosowania medyczne, a następnie omawia poszczególne pola zastosowań. Nanocząstki mogą być wykorzystywane jako negatywne środki kontrastujące w metodzie MRI, jako nośniki leków oraz kwasów nukleinowych, w terapii hipertermicznej, obrazowaniu komórek oraz inżynierii tkankowej.

Ostatni podrozdział części literaturowej (2.4) jest w porównaniu z poprzednimi dość rozbudowany i dotyczy tzw. nanocząstek wielofunkcyjnych. Doktorantka podaje liczne przykłady funkcjonalizacji nanocząstek pozwalające na ich wykorzystanie do jednoczesnego obrazowania co najmniej dwiema technikami. W tym kontekście wymieniane są m.in. metody obrazowania fluorescencji, pozytonowej tomografii emisyjnej, tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów, ultrasonografii i innych. Nieco dziwi brak na tej liście tomografii komputerowej, która jest jedną z najpowszechniejszych metod trójwymiarowego obrazowania medycznego.

Część literaturowa pracy doktorskiej mgr Kani sprawia dobre wrażenie. Oczywiście jak zawsze dyskusyjne jest to, czy wszystko się w niej znalazło. Nie ma tu jednoznacznych wskazówek, choć wydaje się rozsądnym przyjęcie, że część literaturowa powinna zawierać takie informacje, aby osoba niebędąca specjalistą mogła w stopniu podstawowym zrozumieć część badawczą pracy. Jeśli przyjąć takie kryterium, wydaje się, że w przeglądzie literaturowym zabrakło omówienia podstaw fizycznych zjawiska rezonansu magnetycznego, zasady metody MRI oraz bardziej szczegółowej dyskusji przyczyn fizycznych, dla których nanocząstki superparamagnetyczne skracają czasy relaksacji T_2 . Przydatne byłoby również omówienie jaki jest typowy los nanocząstek po podaniu dożylnym, w jakich narządach się najczęściej akumulują oraz jakie wywołuje to efekty niepożądane.

Część badawcza rozprawy doktorskiej liczy 48 stron i składa się z dwóch głównych rozdziałów, w których omówione zostały wyniki badań nanocząstek odpowiednio tworzących klastery oraz umieszczonych w polimerosomach. Układ części badawczej nie jest w pełni klasyczny. Każdy z dwóch rozdziałów tworzy w pewnym sensie odrębną całość, w każdym z nich osobno opisywane są stosowane materiały, aparatura, wreszcie wyniki i ich dyskusja. W ocenie recenzenta taki układ pracy jest niezbyt korzystny, a wynika on najprawdopodobniej z tego, że wyniki badawcze zostały uprzednio opisane w dwóch artykułach (w *Journal of Nanoparticle Research* i *Journal of Materials Chemistry B*), i układ treści w dużym stopniu powielił ten z publikacji. Należało raczej całości wyników nadać nową strukturę, tak aby stanowiły w miarę możliwości spójną całość.

W rozdziale 3.1 opisywane są materiały stosowane w pracy eksperymentalnej (dla nanocząstek modyfikowanych chitozanem). Bez wątplenia lista użytych odczynników nie jest kompletna, właściwie praktycznie wcale nie są uwzględnione odczynniki stosowane w eksperymentach biologicznych (informacja o nich pojawia się za to w opisie aparatury). Opis syntezy pochodnych chitozanu (podrozdział 3.1.1) nie budzi zastrzeżeń, ewentualnie Autorka mogła zamieścić reprezentatywne widma ^1H NMR otrzymanych związków, w celu ilustracji sposobu wyznaczania stopnia podstawienia. Kolejny podrozdział (3.2) opisuje aparaturę i metody doświadczalne, po czym Autorka ponownie powraca do omawiania procedur syntetycznych, tym razem syntezy nanocząstek i modyfikacji ich powierzchni. W opisie otrzymywania nanocząstek pokrytych kationową pochodną chitozanu wspomniane jest (str. 59), że stosowane są dwa różne stężenia tego polimeru (1 lub 3 g/l), ale jak się wydaje wyniki dotyczące charakterystyki otrzymanych nanocząstek przedstawiane są w dalszej kolejności tylko dla niższego stężenia. Dlaczego? Jak dalsze zmniejszenie stężenia chitozanu (np. 0.5 g/l) wpłynie na właściwości otrzymanego produktu; czy możliwe jest otrzymanie nanocząstek, które nie grupują się w klastery? Autorka powinna też wyjaśnić, czemu nie stosuje anionowej pochodnej chitozanu bezpośrednio w trakcie współstrącania nanocząstek. W opisie funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek barwnikiem Alexa Fluor 647 zabrakło krótkiego wyjaśnienia, jakiego rodzaju wiązanie tworzy się podczas tego procesu.

W rozdziale 3.5 przedstawione zostały wyniki dotyczące charakterystyki fizykochemicznej nanocząstek. W pierwszym rzędzie omówiono pomiary potencjału zeta dla trzech różnych typów nanocząstek. Wyniki te potwierdzają modyfikację odpowiednio polimerem (kationowym, anionowym) oraz barwnikiem. Wyniki TEM pokazują obecność nanocząstek o rozmiarach ok. 11 nm, przy czym struktury modyfikowane anionową formą chitozanu są nieco mniejsze. Autorka tłumaczy to w następujący sposób: "Różnica wynika z

jakości zdjęć, na których dokonywano zliczeń, gdyż na zdjęciach wysokorozdzielczych (lepiej jakości) pracowano w przypadku SPION-CCh, a na tych w jasnym polu w przypadku SPION-ACh." Dlaczego Autorka nie przeprowadziła pomiarów w tych samych warunkach?

Na podstawie pomiarów termograwimetrycznych Autorka szacuje zawartość procentową składników organicznych zakładając, że ulegają one całkowitej dekompozycji pod wpływem temperatury. Z termogramu na Rys. 13 wynika jednak, że nie została osiągnięta stała masa, a więc nie cały materiał organiczny został rozłożony. Tym samym wyznaczona zawartość składników organicznych w próbce jest zapewne zawyżona. Na podstawie wyników TGA Doktorantka ocenia, że ilość polimeru jest na tyle duża, że pozwala to na całkowite opłaszczenie rdzeni tlenku żelaza, a z drugiej "nie wpływa negatywnie na magnetyzację tego materiału". Dlaczego obecność polimeru ma wpływać znacząco na magnetyzację wyrażaną na masę żelaza (tym bardziej, że pomimo ok. 30% zawartości polimeru, magnetyzacja nasycenia bliska jest tej dla magnetytu, o czym mowa na str. 67)? Może chodzi raczej o wpływ na czas relaksacji T_2 ? Czy Autorka mogłaby oszacować jaka powinna być grubość warstwy organicznej zakładając, że nanocząstki są od siebie odseparowane i nie tworzą klastrów?

Na podstawie wyników FTIR i przesunięcia pasma dla pierwszorzędowej grupy aminowej ($1572 - 1564 \text{ cm}^{-1}$) Autorka wnioskuje, że pochodna chitozanu obecna jest na powierzchni nanocząstek, gdyż grupa ta oddziałuje z jonami żelaza i tworzy kompleks. Czy dodając jonów żelaza do pochodnej chitozanu również obserwuje się taki efekt?

W celu potwierdzenia superparamagnetyczności nanocząstek przeprowadzono pomiary zależności magnetyzacji od przyłożonego pola. Odpowiedni kształt krzywej i brak histerezy świadczy o tym, że nanocząstki wykazują właściwości superparamagnetyczne. Do pełnego potwierdzenia tego faktu należałoby zapewne przeprowadzić jeszcze pomiary temperaturowe oraz ewentualnie badania z wykorzystaniem spektroskopii Mössbauera.

Dalsze badania właściwości magnetycznych nanocząstek prowadzone były metodą mikroskopii sił magnetycznych. Dlaczego z faktu, że zmniejszanie odległości pomiędzy ostrzem i próbką powoduje lepszy kontrast na obrazie MFM ma wynikać, że materiał wykazuje właściwości magnetyczne? Może chodzi raczej o to, że w ogóle widoczny jest obraz MFM mimo oddalenia ostrza od próbki?

W dalszej części rozdziału Autorka omawia przeprowadzone pomiary relaksacyjności. Z wyników tych wynika, że uzyskane relaksacyjności r_2 są nawet 2.5 razy wyższe od wartości mierzonych dla komercyjnych środków kontrastujących. Jest to bardzo ciekawy i wartościowy wynik, jeden z najważniejszych w całej pracy doktorskiej.

Autorka badała również nanocząstki modyfikowane na powierzchni barwnikiem Alexa Fluor 647. W tym celu zarejestrowała absorpcyjne widma elektronowe roztworu nanocząstek. Pasma absorpcyjne są bardzo dobrze wykształcone, co jest nieco zaskakujące. Czy Doktorantka sprawdziła, że sygnał nie pochodzi od barwnika niezwiązanego z nanocząstkami, np. zbierając przy pomocy magnesu nanocząstki i mierząc widmo supernatantu?

Kolejny rozdział (5.6) dotyczy badań dystrybucji nanocząstek po podaniu dożylnym myszom BALB/c. W drugim zdaniu rozdziału mgr Kania pisze, że "obrazowanie fluorescencji na żywym organizmie nie powiodło się (...) co prawdopodobnie wynika ze zbyt małej ilości sondy fluorescencyjnej przyłączonej do powierzchni SPION-CCh", odsyłając do Rys. 20. Na tym komentarz się kończy. W ocenie recenzenta, nawet jeśli wynik był negatywny, należało choć odrobinę rozszerzyć opis tego wymagającego przecież eksperymentu. Być może należało też wyniki te zamieścić na końcu rozdziału, po bardzo interesujących innych danych uzyskanych przez Autorkę.

Do owych interesujących wyników należy zaliczyć obrazowanie *ex vivo* szeregu organów myszy po dożylnym podaniu nanocząstek modyfikowanych barwnikiem Alexa Fluor 647. Wykorzystując przyrząd do obrazowania małych zwierząt udało się zaobserwować fluorescencję płuc, nerek i wątroby dla różnych czasów od iniekcji, co świadczy o akumulacji nanocząstek w tych narządach (Rys. 21 i 22, na obrazach brak skali). Brak fluorescencji pochodzącej od Alexa Fluor 647 w próbce mózgu interpretowany jest w ten sposób, że nanocząstki nie przechodzą bariery krew-mózg, co wydaje się wiarygodnym wytłumaczeniem. Zastanawiające, że nie obserwowano gromadzenia się nanocząstek w śledzionie. Być może wykorzystanie spektrometru (lub mikroskopu) fluorescencyjnego, który jest znacznie czulszy, pozwoliłoby na detekcję nanocząstek w innych organach.

Bardziej szczegółowo badano akumulację nanocząstek w nerkach i wątrobie. W tym pierwszym przypadku przeprowadzono pomiary *in vivo* czasów relaksacji T_2 (Tabela 4), ale wyniki te nie zostały skomentowane. Badano też obecność nanocząstek (ściślej fluorescencję) w próbkach moczu, obserwując maksymalne ich stężenie po czasie ok. 30-60 min.

W podobny sposób jak nerki, metodą MRI badano czasy relaksacji T_2 *in vivo* wątroby w różnych odstępach czasowych. Autorka zaobserwowała znaczące skrócenie czasu relaksacji T_2 , które utrzymuje się przez ok. 14 dni. Interesujące wnioski wynikają również z obrazu histologicznego wycinków wątroby zebranych 24 godziny po iniekcji. Obserwowany jest wzrost aktywności komórek Kupffera, a barwienie Perlisa (błękit pruski) wykazuje zwiększone stężenie jonów żelaza. Na tej podstawie Doktorantka wnioskuje, że nanocząstki

po podaniu dożylnym początkowo krążą w układzie krwionośnym, po czym częściowo wychwytywane są przez makrofagi w wątrobie, gdzie ulegają rozkładowi do jonów żelaza.

Dalsze badania obejmują określenie wpływu nanocząstek na morfologię krwi. Obserwowano stosunkowo niewielki wzrost liczebności białych krwinek, podczas gdy inne parametry krwi pozostawały w normie. Czy wyższy poziom płytek krwi po podaniu nanocząstek modyfikowanych kationowym chitozanem w dawce 2.75 mg Fe/kg (Rys. 26c) jest incydentalny?

Badano również poziom stężenia białek ostrej fazy obserwując podwyższony poziom niektórych z nich, co świadczy o stosunkowo niewielkim stanie zapalnym. Próby wątrobowe (AST, ALT) po podaniu nanocząstek również ulegają pewnemu podwyższeniu, ale jak przekonuje Doktorantka, może to być po części efekt podania środka usypiającego. Pewnemu pogorszeniu ulegają też zdolności filtracyjne nerek, o czym świadczy relatywnie wysoki poziom kreatyniny i mocznika.

Następny rozdział pracy doktorskiej Pani mgr Gabrieli Kani (3.7) dotyczy obrazowania śródbłonna miażdżycowego *in vitro*. Jest to rozdział bardzo krótki: pół strony tekstu, tabela i rysunek. Autorka przekonuje, że w warunkach układu symulującego układ krwionośny nanocząstki modyfikowane fluoroforem nie przechodzą do roztworu zewnętrznego przez ścianki naczyń krwionośnych, ale się w nie wbudowują. Ponadto akumulacja nanocząstek jest zwiększona, gdy w naczyniu krwionośnym występuje stan zapalny, mimo że nie obserwuje się jeszcze gromadzenia blaszki miażdżycowej. Obserwacja ta ma niewątpliwie bardzo ważny potencjał diagnostyczny. Wydaje się, że wyniki przedstawione w rozdziale 3.7 są ciekawe i wartościowe, ale opis jest nieco zbyt lakoniczny. Rysunek 31 jest nieczytelny, w szczególności niewidoczne są oznaczenia liczbowe. W jakich jednostkach podane są wartości w Tabeli 5?

Drugi główny rozdział części badawczej (numerowany jako 4) omawia wyniki otrzymywania polimerosomów modyfikowanych nanocząstkami magnetycznymi. Podobnie jak w rozdziale 3, na początku podana jest lista odczynników i materiałów, opis aparatury i procedur eksperymentalnych. W następnej kolejności zamieszczone są wyniki i ich dyskusja dotyczące charakterystyki polimerosomów.

Sam proces tworzenia niemodyfikowanych polimerosomów jest bardzo ciekawy i ich opis mógłby zostać rozszerzony. Autorka mogłaby nieco bardziej szczegółowo omówić jaki jest przypuszczalny mechanizm tworzenia polimerosomów. Ułatwiłoby to zrozumienie w jaki sposób klastery nanocząstek modyfikowanych kationowym chitozanem wbudowują się w te

struktury. Taka dyskusja prowadzona jest w publikacji w *J. Mater. Chem. B*, której Pani mgr Kania jest współautorką.

Do wykazania tworzenia się polimerosomów została wykorzystana technika cryo-TEM. To bardzo sensowne posunięcie, gdyż zastosowanie standardowej mikroskopii TEM zapewne nie pozwoliłoby uzyskać tak dobrej jakości obrazów. Otrzymane zdjęcia pokazują obecność dość regularnych, pęcherzykowatych struktur. Ich rozmiary wynoszą ok. 200 nm co potwierdzają również pomiary DLS. Jaka jest grubość ścianek polimerosomów? Jak koreluje ona z długością bloków kopolimerów wykorzystanych do ich otrzymania? Wyniki cryo-TEM pokazują też obecność skupisk nanocząstek magnetycznych modyfikowanych kationowym chitozanem. Klasterów nanocząstek jest stosunkowo niewiele i nie są one równomiernie rozłożone w obrębie polimerosomu. Zapewne lepiej by było, gdyby równomiernie wbudowywały się one w struktury polimerowe, ale i tak uzyskany wynik budzi uznanie. Trudno zresztą oczekiwać innych rezultatów, skoro w poprzednim rozdziale jednoznacznie pokazano tworzenie przez nanocząstki hybrydowych klasterów. Wyniki TEM sugerują, że nanocząstki wbudowują się w ścianki polimerosomów, jednakże na podstawie dwuwymiarowych projekcji nie jest to w pełni jednoznaczne. Autorka próbowała wykorzystać metodę AFM do bardziej precyzyjnego określenia lokalizacji nanocząstek. W ocenie recenzenta, pomimo złożoności i trudności pomiarów, uzyskane wyniki są umiarkowanie przekonujące. Prawdopodobnie najlepszą metodą byłoby tu wykorzystanie tomografii cryo-TEM.

Do określenia właściwości magnetycznych zmodyfikowanych polimerosomów wykorzystano metodę mikroskopii sił magnetycznych. Dlaczego nie wykonano pomiarów z wykorzystaniem magnetometru wibracyjnego, podobnie jak w przypadku nanocząstek modyfikowanych chitozanem? Jaka jest procentowa zawartość nanocząstek w hybrydowych polimerosomach (pomiary TGA)?

Przeprowadzone pomiary czasów relaksacji zawieszin magnetycznych polimerosomów potwierdziły, że struktury te mogłyby być wykorzystywane jako środek kontrastujący T_2 w MRI. Uzyskano bardzo wysokie wartości relaksacyjności r_2 , które są porównywalne z najlepszymi wynikami znanymi z literatury. Tak wysokie wartości Autorka przypisuje właściwościom organicznego materiału polimerosomu i jego wysokim stopniem hydratacji, co wydaje się wiarygodnym wyjaśnieniem.

Ostatni podrozdział (4.5) pracy doktorskiej dotyczy badań polimerosomów w warunkach *in vitro* na hodowli komórek śródbłonna EA.hy926. W pierwszej części podrozdziału omówione zostały badania cytotoksyczności polimerosomów z wykorzystaniem

testu MTT, z których generalnie wynika, iż nie są one toksyczne i nie wpływają negatywnie na przeżywalność komórek. Brak cytotoksyczności polimerosomów jest oczywiście wynikiem bardzo korzystnym z punktu widzenia zastosowania takich struktur zarówno jako środków kontrastujących w MRI, jak i jako nośników leków. W dalszej części podrozdziału 4.5 zaprezentowane są wyniki badań wnikania polimerosomów do komórek śródbłonna na podstawie selektywnego barwienia fluorescencyjnego i obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Polimerosomy zawierające nanocząstki modyfikowane chromoforem Alexa Fluor 647 były inkubowane z komórkami przez 24 godziny, a następnie barwione z wykorzystaniem fluoroforu Hoeschst 33342, który akumuluje się w jądrach komórkowych. Efekt obrazowania z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego jest z punktu widzenia naukowego niezwykle interesujący, a z punktu widzenia estetycznego - piękny. Trójwymiarowa rekonstrukcja obrazu pozwala potwierdzić, że nanocząstki wnikają do komórek. Można co najwyżej zastanawiać się, dlaczego wybarwiane były jądra, a nie błona komórkowa lub cytoplazma. Wtedy wynik byłby najprawdopodobniej jeszcze bardziej jednoznaczny... ale czy równie urzekający?

Pracę doktorską kończy półtorastronicowe podsumowanie. Grupuje ono najważniejsze osiągnięcia przedstawione w pracy i nie budzi zastrzeżeń (poza niektórymi kwestiami zasygnalizowanymi powyżej).

W recenzjach prac doktorskich zazwyczaj wylicza się błędy i nieścisłości językowe, błędy w numeracji rysunków, odnośników literaturowych, itp. W tak długim tekście jak praca doktorska trudno o brak pomyłek i błędów, które jednak nie wpływają na zawartość merytoryczną pracy. Recenzent ograniczył się w tym przypadku do jednej tego typu uwagi. Na pierwszej stronie rozprawy, w tytule, w słowie "żelaza" zakradł się błąd literowy. Tu rada dla Pani mgr Kani: zawsze należy czytać tytuły swoich prac naukowych.

Z obowiązku recenzenckiego należy dodać, że praca zawiera 41 rysunków i ilustracji, 7 tabeli oraz 159 pozycji literaturowych. Na wstępie rozprawy zamieszczone jest streszczenie (w wersji polskiej i angielskiej), a na końcu informacje o dorobku naukowym mgr Kani: publikacjach naukowych i popularnonaukowych, zgłoszeniach patentowych i licznych wystąpieniach konferencyjnych.

Wnioski końcowe

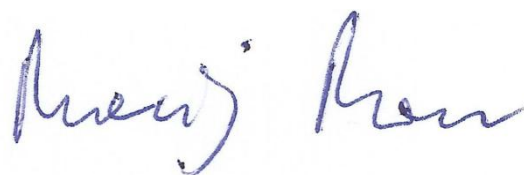
Po starannym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Gabrieli Kani oceniam, że cele pracy zostały jasno sformułowane, a zastosowane materiały i metody badawcze

pozwoły na ich pomyślną realizację. Praca wpisuje się w dynamicznie rozwijany na całym świecie nurt badań nad otrzymywaniem biokompatybilnych materiałów nanokoloidalnych, które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce oraz terapii wielu chorób. Uważam, że głównym atutem rozprawy doktorskiej Pani mgr Gabrieli Kani jest niezwykle szeroki zakres prowadzonych badań i kompetentne wykorzystywanie metod i wiedzy z różnych dziedzin nauki. Jestem pod ogromnym wrażeniem pomysłowości, erudycji i dojrzałości naukowej Autorki. Ważny jest również aspekt aplikacyjny uzyskanych wyników badawczych. Oprócz czterech bardzo dobrych publikacji naukowych, Pani mgr Kania jest współautorką patentu krajowego oraz patentu międzynarodowego, które dotyczą otrzymania nanocząstek magnetycznych.

Należy podkreślić, że podniesione w recenzji kwestie mają charakter polemiczny i nie wpływają na ogólną bardzo wysoką ocenę całej pracy. Wielość uwag wynika przede wszystkim z przekonania recenzenta, że obrona rozprawy doktorskiej powinna być okazją do pogłębionej dyskusji o wynikach badawczych kandydatki na doktora.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że praca doktorska spełnia wszelkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani Gabrieli Kani do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką ocenę merytoryczną pracy doktorskiej, jej nowatorstwo i interdyscyplinarność, jak również fakt opublikowania części wyników badawczych w formie znaczących publikacji i zgłoszeń patentowych, wnioskuję o jej wyróżnienie.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Krzysztof Kania', is positioned in the lower right quadrant of the page.