

Dr hab. Krzysztof Szczubiałka, prof. UJ  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Jagielloński  
Ingardena 3  
30-060 Kraków  
Tel. 12 6632062  
Email: szczubia@chemia.uj.edu.pl

Kraków, 22 grudnia 2015

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Mgr Lidii Libowicz-Nadobny  
pt. „Nanostrukturalne materiały hybrydowe  
dla potrzeb regeneracyjnej terapii ortopedycznej”**

Celem pracy doktorskiej Pani Mgr Lidii Libowicz-Nadobny było otrzymanie i zbadanie właściwości fizykochemicznych nanostrukturalnych hybrydowych układów polimerowo-nieorganicznych oraz określenie ich właściwości biomedycznych pod kątem możliwości ich zastosowania w regeneracji tkanki kostnej.

Regeneracja tkanki kostnej jest skomplikowanym procesem, zachodzącym w sposób ciągły podczas życia człowieka. Staje się on szczególnie ważny w przypadku rozległych uszkodzeń szkieletu spowodowanych przez uraz, infekcję, proces nowotworowy i patologie układu kostnego takie jak np. osteoporoza. Obecnie istnieje bardzo wiele różnych metod wspomagania procesu regeneracji kości, wśród których złotym standardem wydaje się być autologiczny przeszczep kości. Alternatywne metody obejmują przeszczep allogeniczny oraz zastosowanie substytutów kości, takich jak np. rusztowania będące tematem pracy doktorskiej Pani Mgr Lidii Libowicz-Nadobny. Rozwiązania tego typu zyskują na znaczeniu ze względu na coraz mniejszą dostępność organów nadających się do przeszczepów. Trudno jest więc przecenić znaczenie tematyki badawczej, której dotyczy praca doktorska Pani mgr Lidii Libowicz-Nadobny.

Otrzymane i badane przez Doktorantkę rusztowania były układami hybrydowymi. Składnikiem nieorganicznym otrzymanych przez Doktorantkę rusztowań były nanocząstki

hydroksyapatytu, który jest również nieorganicznym składnikiem kości. Nanocząstki te stabilizowane były biopolimerami, którymi były pochodne polisacharydów - chitozanu i hydroksypropylocelulozy (HPC). Doktorantka otrzymała zarówno kationowe jak i anionowe ich pochodne. Kationową pochodną chitozanu otrzymała w reakcji tego polimeru z chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym, natomiast anionową pochodną był chitozan podstawiony grupami sulfonianowymi otrzymany w reakcji kompleksu tlenku siarki (VI) z trimetyloaminą. W przypadku HPC Doktorantka zastosowała odmienną metodę modyfikacji otrzymując odpowiednie polimery szczepione. Otrzymaną przez Doktorantkę kationową pochodną HPC był ten polimer szczepiony poli(chlorkiem 3-akrylamidopropylo)trimetyloamoniowym, natomiast pochodną anionową HPC Doktorantka otrzymała poprzez szczepienie jej poli(styrenosulfonianem sodowym). Otrzymanie tych pochodnych Doktorantka potwierdziła metodami spektroskopowymi, które posłużyły jej również do wyznaczenia stopnia modyfikacji otrzymanych polimerów, wyrażonego jako procent grup glukozowych podstawionych odpowiednio grupami amionowymi i sulfonianowymi. Aby umożliwić zastosowanie metod wykorzystujących zjawisko fluorescencji (spektroskopia fluorescencyjna, konfokalna mikroskopia fluorescencyjna) Doktorantka otrzymała również polimery znaczone fluoresceiną.

Jako matryce rusztowań Doktorantka otrzymała szereg polimerowych materiałów hydrożelowych opartych na chitozanie usieciowanym genipiną - naturalnym i nietoksycznym związkiem sieciującym.

Ciekawym rozwiązaniem zastosowanym przez Doktorantkę było wprowadzenie do tych rusztowań nanocząstek hydroksyapatytu stabilizowanych również chitozaniem lecz zmodyfikowanym kationowo. Dzięki takiemu doborowi składników Doktorantce udało się uzyskać układ, w którym wiązania koordynacyjne pomiędzy grupami aminowymi w chitozanie a wapniem występującym w strukturze hydroksyapatytu hamują wzrost kryształów pozwalając na otrzymanie materiałów w nanometrycznym zakresie rozmiarów.

Inną ciekawą metodą syntetyczną wykorzystaną przez Doktorantkę było połączenie syntezy nanocząstek hydroksyapatytu z procesem koacerwacji anionowej i kationowej pochodnej hydroksypropylocelulozy. Zastosowanie tej metody pozwoliło na uzyskanie nanocząstek o odmiennym morfologii i mniejszych rozmiarach niż te stabilizowane pochodnymi chitozanu oraz o potencjale zeta, który można było kontrolować w szerokim zakresie wartości. Doktorantka scharakteryzowała zależność wielkości i potencjału zeta powstałych nanocząstek od stosunku polianion/polikation.

Otrzymane przez Doktorantkę układy zawierały również nośniki substancji biologicznie aktywnych, w których immobilizowane zostały: enzym - fosfataza alkaliczna i hormon - insulina. Oba te białka wywierają istotny wpływ na proces różnicowania się komórek macierzystych w kierunku komórek kostnych. W przypadku fosfatazy alkalicznej nośnikami tymi były sieciowane jonami wapnia mikrosfery na bazie alginianu i hydroksypropylocelulozy, natomiast do uwalniania insuliny Doktorantka użyła mikrosfer otrzymanych ze zmodyfikowanego kationowo chitozanu i siarczanu chondroityny. Doktorantka wyznaczyła zarówno wydajność enkapsulacji tych białek, jak i szybkość ich uwalniania z otrzymanych mikrosfer. Wykazała też, że na profil uwalniania fosfatazy alkalicznej z mikrosfer korzystnie wpływa umieszczenie ich w matrycy polimerowej na skutek osadzenia się warstwy dodatnio naładowanych łańcuchów chitozanowych tworzących matrycę na ujemnie naładowanych mikrosferach. Autorka słusznie zauważyła, że na profil ten ma również wpływ stopień usieciowania polimeru stanowiącego matrycę.

Doktorantka klasycznie podzieliła rozprawę na część literaturową i eksperymentalną. W części literaturowej opisała zagadnienia chemiczne, biologiczne i medyczne związane ze badanymi przez siebie materiałami. W części eksperymentalnej dokładnie opisała zastosowane techniki badawcze, przeprowadzone syntezy oraz szczegółowo opisała właściwości fizykochemiczne i biologiczne otrzymanych układów.

Pisząc rozprawę Doktorantka nie ustrzegła się jednak od pewnych niedociągnięć i niejasności merytorycznych. W szczególności:

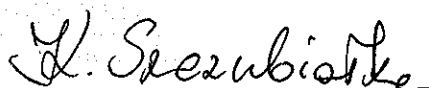
1. Doktorantka nie podała, w jakich warunkach otrzymano stabilizowane nanocząstki hydroksyapatytu o właściwościach podanych w Tabeli 3. Ponieważ stwierdziła Ona, że potencjał otrzymanych nanocząstek silnie zależy od stężenia reagentów i stosunku polikation/polianion i że tylko niektóre otrzymane przez Nią nanocząstki są stabilne, podanie tych informacji byłoby bardzo celowe.
2. Dane pokazane na Rysunkach 34, 40 i 61 nie podają błędów poszczególnych pomiarów, dlatego trudno jest ocenić jak istotne statystycznie są wyciągnięte na ich podstawie wnioski. W szczególności nie można ocenić czy widoczny na Rysunku 40 efekt zwiększenia liczby komórek przy większych stężeniach nanocząstek jest rzeczywisty.

Podobne uwagi dotyczą Rysunku 61 i kilku innych późniejszych rysunków podających zależność liczby komórek od różnych czynników.

3. W rozdziale 9.1.1. Doktorantka stwierdza „Pomimo, że nanocząstki HAP posiadają na swojej powierzchni liczne grupy hydroksylowe układ ten jest niestabilny”. O stabilności decyduje jednak potencjał zeta, a nie obecność zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych grup hydroksylowych.
4. Wzór na stronie 65 - brak jest opisu zmiennych występujących we wzorze
5. W opisie pomiaru kąta zwilżania na stronie 66 brak jest informacji, w jaki sposób otrzymano warstwy polimerowe
6. Bardziej poprawna jest nazwa „testy cytotoxyczności” niż „testy cytotoxyczne”.

Chciałbym jednak podkreślić, że uwagi powyższe mają w dużym stopniu charakter uściśleń, uzupełnień i komentarzy, w tym też takich, które wyrażają subiektywną opinię recenzenta, w żaden więc sposób nie podważają merytorycznej wartości pracy.

Stwierdzam więc, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Mgr Lidii Libowicz-Nadobny spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2013 r. z późniejszymi zmianami. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani Mgr Lidii Libowicz-Nadobny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Krzysztof Szczubiałka