

Oponentský posudek disertační práce Ing. Anny Kohutové

Disertační práce Ing. Anny Kohutové se zabývá charakterizací a termochemickou studií fosforečnanů vápenatých, které představují důležité sloučeniny, vyskytující se v živých organismech. Použité materiály byly studovány pomocí elektronové mikroskopie, rentgenovou difrakční analýzou, Ramanovou spektroskopií a optickou emisní spektroskopií. Krystalizační energie fosforečnanů vápenatých, hydroxyapatitu a biologických hydroxyapatitů byly studovány kalorimetrickými metodami. Byly studovány i rozpustnosti použitých materiálů v simulovaném biologickém prostředí.

Ze zadání disertační práce bych předpokládal, že těžiště práce bude spočívat v použití kalorimetrických metod, také proto, že termodynamické oddělení katedry anorganické technologie je velmi dobře vybaveno vhodným přístrojovým vybavením a disponuje i velmi zkušeným personálním potenciálem. Pro řešení některých problémů byl využit pouze izoperibolický kalorimetr, konstruovaný před lety na katedře fyzikální chemie. Domnívám se, že autorka disertace vypracovala předloženou práci převážně na Ústavu anorganické chemie AV ČR a pochopitelně pro řešení předložené práce přednostně použila experimentální výbavu tamního pracoviště.

Musím se přiznat, že rozsah předložené disertační práce mne poněkud překvapil. 266 citovaných prací svědčí o značné pracovitosti autorky, přičemž publikované práce, na kterých se autorka disertace podílela, nejsou v seznamu zahrnuty a jsou uvedeny na konci práce.

Teoretická část o rozsahu šedesáti stran je zpracována přehledně a poskytuje čtenáři dostatečný podklad pro pochopení záměrů autorky při řešení zadaného úkolu.

Experimentální část předložené disertace je zpracována rovněž velmi kvalitně. Mne osobně nejvíce potěšilo, že autorka při získávání biologických materiálů spolupracovala s Lékařskou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Již v minulosti nám bylo jasné, že podobný výzkum se nedá realizovat bez přímé účasti klinických lékařských pracovišť. Vzorem nám byla Univerzita Palma Mallorca, která si přímo na lékařské fakultě vybudovala fyzikálně-chemickou laboratoř pro bezprostřední kontakt s pacienty.

K předložené práci mám pouze dvě kritické poznámky. První poznámka se týká citované literatury. Přes značný počet citací autorka nenavázala na práce, vzniklé na katedře anorganické technologie, publikované v letech 1990 až 2000, kdy katedra věnovala podobným problémům velkou pozornost. Při řešení studovaných problémů byla obhájena řada doktorských disertací, dosažené výsledky byly prezentovány na mezinárodních konferencích a celý výzkum byl součástí mezinárodních spoluprací převážně s katedrami fyzikální chemie univerzit ve Španělsku, Rakousku a Německu. Podle mého přesvědčení by autorka disertace mohla na některé dosažené výsledky vhodně navázat.

Moje druhá připomínka se týká teplotní závislosti krystalizačních entalpií zkoumaných vzorků CaP. Při použití pouze 3 teplot se o teplotní závislosti nedá seriózně hovořit.

Závěrem bych chtěl konstatovat, že předložená disertační práce svědčí o velké pracovitosti autorky. Při čtení předložené disertace jsem získal dojem, že autorka je velmi schopná mladá dáma, kterou vědecká práce baví, nečiní jí potíže svoje práce prezentovat na mezinárodním vědeckém fóru a je u ní předpoklad dalšího vědeckého růstu, zvláště když na delší dobu navštíví podobná pracoviště v zahraničí, což v případě, že setrvá v AV, je velmi pravděpodobné.

Předloženou disertaci Ing. Anny Kohutové doporučuji k obhajobě a udělení hodnosti PhD.



Doc. Ing. Vratislav Velich, CSc.

V Pardubicích 9. prosince 2012

Oponentní posudek disertační práce
**CHARAKTERIZACE A TERMOCHEMICKÁ STUDIE BIOLOGICKÝCH
FOSFOREČNANŮ VÁPENATÝCH**

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, katedra anorganické technologie,
2012

Vědní obor: Anorganická technologie

Doktorand: Ing. Anna **Kohutová**

Školitel: Doc.Ing. Ladislav **Svoboda**, CSc.

Rozsah práce: 156 stran textu včetně příloh, 55 obrázků a 266 citací literatury

Posuzovaná doktorská práce se soustředí na biologicky významné fosforečnany vápenaté (hydroxyapatit, beta- a amorfní fosforečnan vápenatý), přičemž na základě posouzení strukturních, fyzikálně-chemických a termochemických (termodynamických) vlastností se autorka snaží kvantitativně objektivizovat možné rozdíly mezi těmito sloučeninami připravenými syntetickou, respektive biologickou cestou (zubní a kostní matrice, ledvinové kameny). Takovouto problematiku pokládám za ryze aktuální a přínosnou, především s ohledem na bezprostřední využití dosažených poznatků při vývoji biokompatibilních tkáňových náhrad pro medicínské aplikace.

Celá práce je přehledná, s názornými a vhodně zvolenými obrázky. Teoreticko-rešeršní část vychází z více než 250-ti literárních pramenů, což je zcela neobvyklé a obsáhlostí svého zpracování se tím blíží spíše (kvalitní) monografii. Z vyznění práce je zřejmý odpovědný a pečlivý přístup autorky k řešení daného tématu. Nadchla mne nápaditost, s jakou byly kalorimetricky stanoveny hodnoty (přímo neměřitelné) krystalizační enthalpie, a oceňuji důslednost, s jakou byla dosažená data (statisticky) zpracována a verifikována. Vítám, že autorka „explicitně“ (a férově) uvádí jména spolupracovníků, kteří provedli příslušná měření (speciálními) metodami jako SEM-EDAX či Ramanova spektrometrie (str. 60). Celkově práci hodnotím jako velmi zdařilou, přičemž její hlavní přínos spatřuji v širokém spektru použitých experimentálních postupů (XRD, SEM-EDAX, Raman S, ICP-OES, DTA-TG, kalorimetrie) a v důsledné verifikaci, interpretaci a syntéze dosažených výsledků.

Drobné připomínky, které k práci (přece jen) mám, shrnuji následovně:

- Str. 14: Uvedená bilanční rovnice (2-17) platí (pouze) pro adiabatické podmínky; do obecného vztahu pro popis kalorimetrické soustavy je nutno kromě akumulčního členu zahrnout také člen vodivostní - tzv. Tian-Calvetova rovnice.
- Str. 41: V rovnici (2.36) chybí u aktivitních koeficientů γ exponenty ν (na které jsou hodnoty γ umocněny).
- Str. 66, kap. 3.5, 1. odst.: Temperace dvoustěnné nádoby na teplotní úrovni 25, 37 resp. 45 °C byla zřejmě zabezpečována spíše termostatem nežli (jak je uvedeno) kryostatem.
- Str. 70, 3. řádek odspodu: „Konec reakce se projevil ustálením konstantní hodnoty ΔU na čase“. U isoperibolického kalorimetru se signál po ukončení sledovaného děje (obecně) neustálí, ale po dosažení maxima začíná klesat.
- Str. 72, 77, 81 a j.: Jakkoliv je metoda XRD bezesporu velice přesná, uvádění zjištěných mřížkových parametrů s přesností na 6 platných číslic přece jen pokládám za neadekvátní.

Mé následně uváděné dotazy necht' jsou prosím chápány spíše jako možný příspěvek do diskuze při vlastní obhajobě.

- Str. 65: Při měření metodou ICP-OES bylo pH roztoků upravováno pomocí cesiového pufru. Takovýto typ pufru nepovažuji za zcela běžný, a proto bych uvítal osvětlení možných důvodů, které upřednostňují používání takového (netypického) pufracího média před „běžnými“ puframi ?
- Str. 68 a 69: Zaujalo mne, že pro vyhodnocování tepelných efektů na isoperibolickém kalorimetru se v případě kalibračních měření odečítá „výška ΔU “ v čase, kdy teplotní změna odpovídá $0,5 \Delta U$ (obr. 24), zatímco u vyhodnocování reakčních tepel se odečítá „výška ΔU “ v čase, kdy je teplotní změna rovna $0,63 \Delta U$ (obr. 25). Uvítám bližší osvětlení této nejednotnosti.
- Str. 71, 3.odst.: Je uvedeno, že „*XRD analýza potvrdila přítomnost (hydroxyapatitu) HA ve (dvou) studovaných ledvinových kamenech (označených) KS3 a KS6. Po termické analýze byla tato složka (HA) objevena navíc i v (ledv. kamenech) KS4 a KS5.*“ Rozumím tomu správně, že termická analýza se v tomto případě ukázala jako citlivější metoda pro fázovou (speciální) analýzu daných vzorků nežli *XRD* ?
- Str.104 (a j.): Hmotnostní spektrometrie plyných složek uvolňovaných během DTA-TG měření vykázala (m.j.) i „spektrální čaru“ při hodnotě 28 daltonů, která je interpretována jako oxid uhelnatý (tab. 44). Není možné v té souvislosti uvažovat (i) o elementárním dusíku N_2 , když přítomnost oxidů dusíku NO i NO_2 ve spektru prokázána byla ?

Celkové hodnocení:

Zaměření práce na biologicky významné fosforečnany vápenaté pokládám za aktuální a přínosné. Zpracování řešeného tématu je komplexní a důsledné. Oceňuji nápaditost kalorimetrických šetření pro stanovení (přímo těžko postihnutečných) hodnot krystalizační enthalpie. Dosažené výsledky jsou evidentně původní a byly již publikovány v impaktovaných mezinárodních periodikách.

Celkově práci pokládám za výbornou a rád ji doporučuji k obhajobě.

Ostrava 6. prosince 2012


Boleslav Taraba (Prof., Ing., CSc.)
katedra chemie PřF
Ostravská univerzita
30.dubna 22, 701 03 Ostrava 1

Oponentský posudek

na disertační práci **Ing. Anny Kohutové**

„Charakterizace a termochemická studie biologických fosforečnanů vápenatých“

Předložená disertační práce se zabývá metodami přípravy, charakterizací a studiem hydroxyapatitu, β -fosforečnanu vápenatého a amorfního fosforečnanu vápenatého, jako důležitých sloučenin vyskytujících se v živých organismech. Byly porovnávány vlastnosti synteticky připravených sloučenin a preparátů biologického původu. Vzorke studovaných materiálů byly zkoumány pomocí elektronové mikroskopie, rentgenovou difrakční analýzou, rentgenovou mirodifrakcí, Ramanovou spektroskopií, optickou emisní spektroskopií a rovněž studiem termodynamických vlastností.

Cílem práce bylo nalezení optimálních reakčních podmínek pro přípravu fosforečnanů vápenatých o vlastnostech blízkých biologickým analogům a provedení strukturní a chemické analýzy obou typů těchto materiálů pomocí a na základě termochemických studií navrhnout metodiku stanovení krystalizační entalpie studovaných látek, experimentálně ji ověřit v podmínkách simulovaného fyziologického prostředí a porovnat získaná data s publikovanými údaji.

Předložená práce má 156 stránek, 266 literárních odkazů. Je doplněna tabulkami a grafy, obrázky a přílohami.

Na 52 stranách autorka popisuje teoretické principy a dostupné literární informace. Na str. 17, v části 2.3. *Krystalizace* bych uvítala zmínku, že se jedná o krystalizaci z roztoků. Dále je uvedeno, že... *krystalizace je zpravidla provázena exotermickým efektem*. Znamená to, že může být krystalizace endotermická?

Pro větší přehlednost by bylo lepší obrázky na stranách 45-54 zvětšit. Na str. 45, na obrázku 12, chybí popis osy y.

Na str. 68, obrázek 24 a 25 - je možné říci přibližně při jakých změnách ΔU (osa y) a při jakých časech (osa x) k pozorovaným změnám dochází?

Symbol Δ znamená změnu veličin. V seznamu použitých symbolů a zkratk na str. 132. se tedy jedná o změnu veličin na řádku 16 - 32.

V kapitole výsledky a diskuze je sepsána studie biologicky významných fosforečnanů vápenatých po stránce jejich strukturních a termochemických vlastností. Jedná se o komplexní studii. Kombinace chemických a fyzikálních metod, které byly pro tuto studii zvoleny (*XRD*, *SEM-EDX*, *RS*, *ICP-OES*, *DTA-TG*, reakční kalorimetrie), se skutečně jeví jako velmi vhodná pro charakterizaci laboratorně připravených i biologických vzorků CaP. Prostřednictvím těchto metod bylo možné ve zkoumaných vzorcích určit fázová zastoupení CaP, zjistit velikosti krystalitů, mřížkové parametry, stupeň krystalinity i obsahy prvků. Byl posouzen vliv kalcinace na mřížkové parametry a poměrové zastoupení krystalických fází kalcinovaných vzorků.

Studiem biologických vzorků bylo zjištěno, že zubní materiály obsahují dvě odlišné fáze HA s rozdílnými mřížkovými parametry a velikostmi částic. Ve vzorcích ledvinových kamenů bylo identifikováno minoritní zastoupení HA, v kalcinovaných vzorcích HT byl nalezen krystalický fosforečnan vápenatý ve formě whitlockitu (WHI), zřejmě v důsledku transformace částečně krystalické fáze HA. Vzorek laboratorně připraveného β -TCP byl na rozdíl od ACP termicky zcela stabilní.

Syntetizovaný vzorek HA (sHA) se kalcinací transformoval ze 74 hm% na vysokoteplotní formu α -TCP, na rozdíl od komerčního cHA, který z 9 hm% přešel na fosforečnan tetravápenatý. Rozdílnost kalcinačních produktů byla způsobena rozdílnou metodou přípravy obou syntetických vzorků HA, neboť sHA byl připravován z vodných roztoků, na rozdíl od komerčního cHA, který byl připraven hydrotermální metodou a poté sintrován.

Byly určeny mřížkové parametry zkoumaných CaP, které odpovídaly publikovaným údajům. Kalcinací docházelo ke kontrakcím strukturní mřížky HA, zvyšování stupně krystalinity a růstu krystalitů HA fází obsažených v kalcinovaných vzorcích. Během termické analýzy vzorků ACP, sHA, BTB, všech vzorků HT a některých vzorků KS obsahujících HA byly identifikovány dehydroxylační procesy probíhající ve struktuře HA.

Rentgenová prášková difrakce vzorků po termické analýze nezaznamenala přítomnost produktů dehydroxylace HA v podobě oxoapatitu ani oxohydroxyapatitu.

Rovněž byla studována krystalizační entalpie pomocí izoperibolického reakčního kalorimetru a modelového fyziologického prostředí, což mělo přiblížit experimentální podmínky procesům probíhajícím v živých systémech. Bylo navrženo schéma aditivních rovnic, které umožnilo stanovení krystalizačních entalpií prostřednictvím vhodně zvolených rozpouštěcích

reakcí. Získaná data prokázala vznik a transformací jednotlivých forem fosforečnanů vápenatých v živých organismech a potvrdila souvislosti mezi tvorbou, restrukturalizací a samoobnovujícími cykly probíhajícími v jejich tkáních. Navržené schéma lze taktéž využít při studiu biochemických procesů „*in vivo*“.

Po stránce formální i jazykové je práce psaná bez podstatných překlepů a v dobré kvalitě.

Kladně je třeba hodnotit i sebevzdělávání doktorandky, viz (str. 142).

I přes uvedené připomínky (spíše formálního charakteru) však mohu konstatovat, že doktorandka prokázala orientaci ve složité problematice některých důležitých sloučenin vyskytující se v živých organismech. V neposlední řadě také prokázala značnou laboratorní zručnost při měření a pečlivost při vyhodnocování výsledků. Cíle práce byly splněny. Předloženou disertační práci proto hodnotím kladně a

doporučuji k obhajobě.

Pardubice 13. 12. 2012



doc. Ing. Eva Černošková, CSc.

SLCHPL ÚMCH AV ČR a Univerzity Pardubice