



Kraków 29.08.2016

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR MONIKI GOŁDY-CĘPY „Application of parylene C for implants surface tailoring: anti-infective and biocompatibility function”

Optymalizacja właściwości materiałów używanych w medycynie stanowi olbrzymie wyzwanie technologiczne. Wobec starzenia się społeczeństwa, rozwoju chorób cywilizacyjnych, a także konieczności zapewnienia komfortu pacjentom rośnie zapotrzebowanie na materiały implantacyjne do produkcji endoprotez, stabilizatorów, wkrętów kostne, implantów stomatologicznych czy stentów. Podstawowym wymogiem stawianym przed tego typu materiałami jest ich niezawodność i jak najlepsza biogodność. Niespełnienie któregoś z tych wymogów powoduje komplikacje pooperacyjne u pacjentów, co oprócz bezpośredniego zagrożenia życia wiąże się z koniecznością przedłużonej terapii lub reoperacji i prowadzi do znaczącego wzrostu kosztów leczenia. Idealny materiał do wytwarzania implantów powinien mieć odpowiednie właściwości mechaniczne, być odporny na korozję w warunkach agresywnego środowiska płynów ustrojowych, być biokompatybilny, t.j. nie powodujący lokalnej infekcji prowadzącej do odrzutu implantu, a jednocześnie umożliwiający regenerację tkanki. Stopy metali, najczęściej na bazie tytanu, niklowo-kobaltowe lub stal chirurgiczna 316L i jej odmiany charakteryzują się wysokimi parametrami mechanicznymi i dużą odpornością na korozję. Jednakże, z czasem pod wpływem środowiska płynów ustrojowych z ich powierzchni uwalniane są wysoce toksyczne jony metali. Jednym ze sposobów uniknięcia procesów korozji jest zastosowanie powłok polimerowych. Powłoki te muszą jednak być odpowiednio modyfikowane celem zapewnienia ich biokompatybilności. Zastosowanie zmodyfikowanych powłok polimerowych dodatkowo umożliwia wbudowywanie w ich strukturę bezpośrednio lub w odpowiednich nośnikach, substancji o znaczeniu terapeutycznym, np., leków przeciwzapalnych lub antybiotyków, które uwalniane lokalnie zapobiegają infekcji i odrzuceniu implantu a nie powodują efektów ubocznych.

Prace badawcze dotyczące rozwoju technologii materiałów biomedycznych są z natury rzeczy multidyscyplinarne i wymagające zaawansowanego zaplecza aparaturowego zarówno w zakresie syntezy i charakterystyki materiałów jak i określenia ich biogodności czy też

efektywności funkcji terapeutycznych. Praca doktorska Pani mgr Moniki Gołdy-Cępy stanowi bardzo dobry przykład badań w zakresie tworzenia i charakterystyki materiałów o perspektywnym zastosowaniu w implantologii. Jej głównym celem było opracowanie wielofunkcyjnej powłoki polimerowej do pokrywania implantów metalowych a prowadzone badania służyły udowodnieniu, że proponowana powłoka parylenu C nanoszona na powierzchnie metalu metodą CVD po odpowiedniej funkcjonalizacji spełnia warunki: ochrony przed korozją i biokompatybilności, ograniczającej ryzyko wystąpienia infekcji oraz może posiadać funkcję terapeutyczną.

Dysertacja mgr Moniki Gołdy-Cępy powstała pod kierownictwem prof. dr hab. Andrzeja Kotarby w Grupie Chemii Powierzchni i Materiałów w Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca stanowi zestaw ośmiu publikacji w czasopismach o obiegu międzynarodowym oraz zgłoszenia patentowego: „A method of manufacturing a multilayer polymer protective coating for implant materials with a controlled drug release function”. Zestaw ten jest poprzedzony obszernym omówieniem, które pozwala na zapoznanie się ze stosowanymi przez doktorantkę metodami badawczymi, umiejscowienie jej prac na tle obecnego stanu wiedzy oraz zebranie głównych wniosków uzyskanych na podstawie wyników przedstawionych w zestawie publikacji. Omówienie to jest napisane w języku angielskim, liczy 80 stron, w tym spis literatury cytowanej składający się z 98 pozycji oraz zawiera konieczne streszczenia w językach polskim i angielskim.

W skład zestawu publikacji wchodzi: cztery artykuły opublikowane w *Materials Science and Engineering: C* (IF 3.338), dwa w *RSC Advances* (IF 3.485) i po jednym w *Materials Letters* (IF 2.412 – artykuł ten ma charakter krótkiej notki) oraz w *ACS Applied Materials & Interfaces* (IF 7.332). Publikacje te były cytowane łącznie 33 razy (wg. *Web of Sciences*). Wszystkie publikacje są wieloautorskimi, przy czym tylko w jednej z nich, najwcześniejszej, powstałej na wstępnym etapie pracy badawczej doktorantki i opublikowanej w 2012 roku, nie jest ona pierwszą autorką. Do zestawu dołączone są oświadczenia współautorów precyzujące ich wkład do poszczególnych publikacji. Dodatkowo doktorantka sama określa swój wkład do poszczególnych prac, który w siedmiu z nich zawiera się w słowach „most (lub) all of the experimental work, data analysis, interpretation and manuscript preparation” co świadczy o jej wiodącej roli. Tylko w przypadku najwcześniejszej publikacji stwierdza skromnie „manuscript preparation”, ale nawet z wyłączeniem tej publikacji proponowany jako praca doktorska zestaw zawiera wystarczający materiał. Pani Monika jest

również współautorką trzech publikacji nie wchodzących w skład pracy doktorskiej oraz dziewięciu wystąpień konferencyjnych wiążących się z tematyką doktoratu.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Gołdy-Cępy zostały opublikowane w wiodących czasopismach międzynarodowych ($IF > 3$), po uzyskaniu pozytywnych ocen ich zawartości, stosowanej metodologii doświadczalnej oraz analizy otrzymanych wyników, dlatego rola recenzenta w przewodzie polega głównie na ocenie doboru zestawu prac oraz ocenie części przedstawionej przez autorkę zawierającej omówienie i podsumowanie prac. Część ta składa się z czterech zasadniczych rozdziałów. W pierwszym z nich „Introduction” autorka przedstawia podstawy naukowe i stan wiedzy, które stanowiły motywacje do podjęcia tematyki modyfikacji powierzchni metalicznych wykorzystywanych w implantach medycznych, określa podstawowe wymogi odnośnie właściwości używanych materiałów, uzasadnia ich dobór, w szczególności powłok z parylenu C, jak również metodykę ich tworzenia. W następnym rozdziale formułuje cele pracy oraz schemat metodologii prowadzonych badań. Kolejny rozdział jest poświęcony omówieniu zastosowanych materiałów i metod eksperymentalnych. Należy podkreślić, że wachlarz metod doświadczalnych jest niezwykle szeroki obejmujący metody charakteryzacji materiałów (XRD, TG/TDA, testy ich właściwości mechanicznych), metody analizy powierzchni (kąąt zwilżania/swobodna energia powierzchniowa, mikroskopia IR, SEM, AFM, LD-MS, Kelvin Probe, XPS, EIS, wyznaczenie potencjału zeta) jak i testy biologiczne adhezji komórek i bakterii oraz cytotoksyczności stosowanych materiałów jak również spektroskopię UV-VIS stosowaną do analizy szybkości uwalniania leków z powłok polimerowych. Wymagało to opanowanie przez doktorantkę przynajmniej podstaw każdej stosowanej metody. Omówienie metod eksperymentalnych jest bardzo skrótowe, a bardziej szczegółowe informacje można znaleźć w publikacjach wchodzących w skład rozprawy. Najobszerniejszy rozdział stanowi przegląd wyników eksperymentalnych uzyskanych przez doktorantkę dotyczących poszczególnych etapów jej pracy poświęconych analizie działania antykorozyjnego powłok parylenu C, nanoszonych na powierzchnie metaliczne metodą CVD, ich modyfikacji w plazmie tlenowej mającej na celu wytworzenie na powierzchni polimeru tlenowych grup funkcyjnych oraz nano- i mikrotopografii powierzchni. Wytworzenie tlenowych grup funkcyjnych prowadzi do biokompatybilizacji powierzchni parylenu, co doktorantka udowadnia poprzez zmianę kinetyki krystalizacji fosforanu wapnia oraz wzrostu i morfologii komórek linii MG-63 (osteosarcoma) na powierzchniach modyfikowanych plazmowo. Zastosowanie modyfikacji plazmowej może prowadzić do zmniejszenia ryzyka wystąpienia infekcji co autorka analizuje badając adhezję

wybranych szczepów bakteryjnych. Stwierdza, że modyfikacja plazmą tlenową powierzchni parylenu C nie wpływa na wzrost skłonności do tworzenia biofilmu, a otrzymany depozyt bakteryjny ma inną strukturę niż na powierzchni niemodyfikowanej jak również kinetyka jego tworzenia jest wolniejsza. Modyfikowane powłoki parylenowe mogą również pełnić funkcje terapeutyczną co doktorantka demonstruje stosując dwie metody modyfikacji powłok polimerowych, poprzez nałożenie na powierzchni modyfikowanego parylenu warstwy kopolimeru PLGA zawierającego zdyspergowane leki przeciwzapalne (ibuprofen, diclofenac) lub antybiotyk (gentamycynę) lub poprzez impregnację w polu ultradźwiękowym warstwy parylenowej gentamycyną. W tym ostatnim przypadku obserwuje wbudowywanie się agregatów gentamycyny w zewnętrzną warstwę powłoki. W obu przypadkach analizuje kinetykę uwalniania leku, która przy odpowiednio dobranych parametrach procesu pozwala na osiągnięcie stężenia odpowiadającego oknu terapeutycznego w dostatecznie długim czasie.

Praca doktorska Pani mgr Moniki Gołdy-Cępy zawiera właściwie dobrany materiał, jest wykonana bardzo starannie pod względem edytorskim, a ilustracje są czytelne i dobrze obrazują otrzymane wyniki doświadczalne. Trudno jest mi ją ocenić pod względem językowym ale nie napotkałem większych błędów (może poza systematycznym brakiem przecinka przed „which”). Mam też tylko kilka uwag o charakterze merytorycznym:

- str. 6. – nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem „hydrophilic or hydrophobic character of surfaces are (powinno być is) determined by the geometry of a water drop on them - ...”. Hydrofobowość/hydrofilowość powierzchni jest determinowana przede wszystkim poprzez rodzaj powierzchniowych grup funkcyjnych oraz mikrotopografie powierzchni, co zresztą autorka słusznie później zauważa;
- str. 19. – na rysunku 2.8 nie ma nic na temat zastosowania powłok parylenowych w elektronice;
- str. 27.- czemu elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna została zaliczona do metod objętościowych skoro służy do badania odporności korozyjnej ?
- str. 33. – „Zeta potential determination” nie zaliczyłbym do metod biologicznych chociaż oczywiście można mierzyć potencjał zeta poszczególnych komórek czy protein;
- str. 36. – zamiast „superhydrophilic” użyłbym „completely wettable” (tak jak to jest w nawiasie);
- str. 38. – „Parylene C degree of crystallinity” miało być osobnym podrozdziałem ?
- str. 60. – powierzchni hydrofilowe mają większą swobodną energię powierzchniową;
- str. 67 – w kopii przeze mnie otrzymanej powtarza się cały paragraf tekstu;

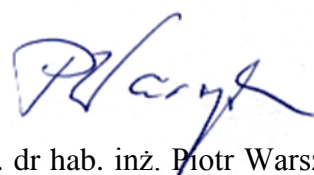
Jedna uwaga ma charakter dyskusyjny i wiąże się z pokazaną przez doktorantkę korelacją pomiędzy pracą wyjścia dla powierzchni stopu tytanowego a adhezją bakterii. Prezentowane przez nią wyniki pokazują, że im mniejsza jest praca wyjścia tym mniejsza jest skłonność do adhezji bakterii na nanostrukturalnej, utlenionej powierzchni stopy tytanu uzyskanej poprzez anodyzację pod różnymi napięciami. Prosta korelacja pomiędzy pracą wyjścia a adhezją sugerowałaby jakiś proces elektrochemiczny, który trudno jest mi sobie wyobrazić. Na rysunku 2 w publikacji I wyraźnie widać, że wraz ze wzrostem napięcia anodyzacji zmienia się struktura warstwy. Powstają widoczne zagłębienia o rozmiarach od ca. 100 do 500 nm, rosnących wraz ze wzrostem napięcia anodyzacji (nb. jak była zdefiniowana porowatość w tabeli 1 w publikacji I). Oddziaływania van der Waalsa komórek z tak niejednorodnymi powierzchniami będą słabsze co może tłumaczyć spadek adhezji. Z drugiej strony praca wyjścia może silnie zależeć od geometrii powierzchni (np. na krawędziach). Dodatkowo potencjał zeta ditlenku tytanu zależy od struktury krystalicznej. W większości pomiarów dla zawiesin nanocząstek TiO_2 punkt izoelektryczny zawiera się w zakresie pH 5.5-7.0, czyli w warunkach fizjologicznych powierzchnia anodyzowanego tytanu będzie słabo ujemnie naładowana. Wprawdzie mierzony zeta potencjał bakterii jest ujemny, jednak nie można wykluczyć że na ich powierzchni istnieją centra naładowane dodatnio (tak jak to jest w przypadku protein), co może prowadzić do adhezji, słabszej w przypadku bardziej niejednorodnej powierzchni.

Druga uwaga dyskusyjna dotyczy modyfikacji powierzchni parylenu C plazmą tlenową. W swojej pracy doktorskiej na rysunku 5.9. autorka zaznacza optymalny czas ekspozycji do plazmy w procesie modyfikacji jako c.a. 6 – 10 minut, w którym to następuje około 10% ubytek masy powłoki parylenowej związany z tworzeniem nanostruktury powierzchni. Z drugiej strony w publikacji III pokazuje, że wprawdzie udział procentowy tlenu na powierzchni ustala się po 10 minutach plazmowego traktowania to znacząca zmiana kąta zwilżania następuje dopiero po około 20 minutach, a w testach adhezyjnych bakterii stosuje czas traktowania 60 minut. Jak to pogodzić ?

Powyższe uwagi nie wpływają na moją zdecydowaną pozytywną ocenę pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Gołdy-Cępy. Uważam, że przeprowadziła ona szereg dobrze zaplanowanych eksperymentów i uzyskała bardzo wartościowe wyniki, które mogą zostać wykorzystane do rozwinięcia technologii produkcji implantów. Do najwartościowszych rezultatów zaliczyłbym:

- wykazanie, że modyfikacja powłok parylenu C plazma tlenową prowadzi do wytworzenia tlenowych grup funkcyjnych nie pogarszając ich właściwości antykorozyjnych;
- wykazanie biokompatybilności modyfikowanych powłok – modyfikacja przyspiesza wzrost osteoblastów w stosunku do tworzenia biofilmu bakteryjnego;
- wykazanie możliwości modyfikacji powłok parylenowych celem nadania im funkcji terapeutycznej.

Podsumowując stwierdzam, że praca mgr Moniki Gołdy-Cępy spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim w „Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuje o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na szeroki zakres interdyscyplinarnych badań, uzyskane niezwykle wartościowe wyniki a także dorobek publikacyjny doktorantki wnioskuje o wyróżnienie pracy w przypadku spełnienia przez nią innych kryteriów określonych przez Radę Wydziału Chemii UJ.



Prof. dr hab. inż. Piotr Warszyński