

Warszawa, 29-10-2015

dr hab. inż. Marcin Pisarek
Mazowieckie Centrum Analizy Powierzchni
Instytut Chemii Fizycznej PAN
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej mgr Magdaleny Jarosz

Praca doktorska Pani mgr Magdaleny Jarosz pt. „Nanoporowaty anodowy tlenek tytanu (IV) jako materiał na implanty kości” jest pracą eksperymentalną, interdyscyplinarną dotyczącą wytwarzania i funkcjonalizacji powierzchni nanoporowatych warstw tlenku tytanu na Ti do zastosowań biomedycznych.

Praca doktorska Pani Magdaleny Jarosz ma standardowy układ i składa się z 5 głównych rozdziałów poprzedzonych spisem treści, wykazem skrótów oraz wstępem do pracy, który pełni rolę wprowadzenia w tematykę dysertacji. Praca zawiera 68 rysunków, w tym: zdjęć, wykresów oraz schematów, a także 12 tabel z wynikami badań własnych Autorki, które w znaczący sposób przyczyniają się do zrozumienia treści pracy. Materiał faktograficzny został dobrze dobrany i wyeksponowany w pracy. Rozdział drugi, liczący 24 strony zawiera część literaturową. Na tej podstawie Autorka rozprawy sformułowała cel badań w formie 5 punktów, które przedstawiła w rozdziale trzecim. Zasadniczą część pracy stanowi obszerny – ponad 90 stronicowy rozdział czwarty poświęcony wynikom badań własnych, analizie tych wyników, a także szczegółowemu opisowi metod badawczych i materiałów użytych do badań. Połączenie części doświadczalnej z rezultatami prac eksperymentalnych uważam, za celowe w pracy, ze względu na dużą ilość stosowanych metod badawczych, specjalistycznych testów biologicznych, co w znaczącym stopniu ułatwiło czytanie i zrozumienie treści pracy. Dobrym pomysłem Autorki, było również sformułowanie częściowych podsumowań, w których zawarto najistotniejsze informacje oraz wnioski z poszczególnych etapów realizacji badań, zaczynając od syntezy nanostruktur tlenkowych, poprzez charakterystykę przedmiotu badań oraz określeniu jego właściwości fizyko-chemicznych, a kończąc na badaniach biologicznych. Ostatnim merytorycznym rozdziałem pracy jest rozdział piąty, który jest

streszczeniem pracy ze szczególnym naciskiem na konkluzje oraz wyeksponowanie, według Autorki, najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej w postaci 7 punktów. Na końcu ostatniego rozdziału doktorantka zawarła spis publikacji naukowych liczący 6 pozycji (w czasopiśmie wysokoindeksowych), gdzie doktorantka była czterokrotnie pierwszym autorem, a które powstały na bazie wyników opisanych w pracy. Ponadto zawarto listę wystąpień konferencyjnych. W ostatniej części pracy Pani Magdalena Jarosz zawarła spis literatury liczący 173 pozycje. Cytowane publikacje, książki, źródła internetowe uwzględniały zarówno wiedzę najnowszą z ostatnich dwóch lat jak i ugruntowaną z poprzednich kilkunastu lat.

Tematyka pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy syntezy nanoporowatych warstw tlenku tytanu metodą utleniania anodowego oraz funkcjonalizacji powierzchni otrzymanych materiałów pod kątem wykorzystania ich w medycynie – jako perspektywiczny materiał na implanty kości. Podjęta tematyka przez doktorantkę wpisuje się w aktualne trendy interdyscyplinarnych badań łączących zarówno wiedzę z dziedziny nauk technicznych jak i wiedzy o życiu. Prace nad zastosowaniem tego typu materiałów w różnych obszarach nauki, m.in. medycynie (jako biomateriały) stanowią źródło inspiracji dla wielu ośrodków badawczych, ze względu na ich nietypową morfologię i budowę, którą można stosunkowo w łatwy sposób kształtować warunkami procesu anodyzacji. Możliwość wytwarzania nanoporowatych warstw tlenkowych o różnej wysokości, a także rozmiarze i kształcie porów prowadzi do kontrolowania ich powierzchni geometrycznej, co jest istotnym parametrem determinującym ich potencjalne zastosowanie. Oprócz czynników geometrycznych zaletą takich warstw, których wzrost odbywa się prostopadle do podłoża metalicznego jest ich jednorodny skład chemiczny, a także struktura/budowa wewnętrzna, którą można kontrolować stosując odpowiednią obróbkę termiczną w temperaturze powyżej 400°C, co wykazano w niniejszej pracy. Odpowiednie dobrane warunki procesu utleniania anodowego oraz obróbki cieplnej wpływają ponadto na właściwości fizykochemiczne otrzymanych materiałów np. zwilżalność. Podsumowując tą część uważam, że Autorka rozprawy doktorskiej wpisała się w nurt wielodziedzinowych prac badawczych z pogranicza chemii, materiałoznawstwa, biologii i medycyny, które są istotne w aspekcie poznawczym, podstawowym jak i aplikacyjnym, co wiąże się z poszukiwaniem optymalnych rozwiązań dla tego typu układów.

Cel pracy

W oparciu o przeprowadzony przegląd literaturowy, w którym Autorka rozprawy zawarła informacje dotyczące ogólnej charakterystyki biomateriałów, właściwości dwutlenku tytanu i jego zastosowań biologicznych, opisu procesu anodyzacji, metod modyfikacji tlenku tytanu poprzez depozycję nanocząstek Ag oraz wprowadzeniu w nanopory leków przeciwzapalnych i antybiotyków sformułowała cele pracy, które odnosiły się do metod syntezy nanoporowatych warstw, funkcjonalizacji ich powierzchni dla celów biomedycznych i sprawdzenia ich działania jako aktywne powłoki wykazujące właściwości antybakteryjne oraz poprawiające biogodność – odpowiedź komórkowa. Postawione cele w rozdziale trzecim zostały omówione w kolejnych rozdziałach pracy.

Cześć doświadczalna

Dla zweryfikowania postawionych założeń pracy Doktorantka przeprowadziła obszerne badania własne, które podzieliły na trzy części: chemiczną, mikrobiologiczną i biologiczną. W części pierwszej Autorka skupiła swoją uwagę na syntezie nanoporowatego TiO_2 metodą utleniania anodowego w zoptymalizowanych roztworach zawierających fluorki przy stałym napięciu w zakresie od 40 do 70 V (proces trójstopniowej polaryzacji), charakterystyce otrzymanych warstw na Ti, zmianie struktury wewnętrznej otrzymanych materiałów przez proces obróbki cieplnej w przedziale temp. od 400 do 1000°C, określeniu właściwości fizykochemicznych, w tym kąta zwilżania oraz funkcjonalizacji powierzchni nanoporowatych struktur poprzez osadzanie nanocząstek Ag metodami chemicznymi, elektrochemicznymi lub poprzez modyfikację lekami. Tak przygotowane podłoża poddano weryfikacji pod kątem ich odpowiedzi biologicznej (testy przyłączania się komórek kostnych MG-63 i ich namnażania w czasie) oraz określenia właściwości antybakteryjnych – testy mikrobiologiczne z użyciem bakterii gramdodatnich (gronkowiec złocisty) i gramujemnych (pałeczka ropy błękitnej) wywołujących często zakażenia wewnątrz szpitalne. W tej części pracy na podkreślenie zasługuje odpowiednio dobrana i umiejętnie wykorzystana przez Autorkę liczba metod badawczych. Świadczy to o dobrym warsztacie badawczym i umiejętnościach eksperymentalnych Doktorantki. Każdy podrozdział w tej części pracy był poprzedzony szczegółowym opisem użytych materiałów do badań oraz zastosowanych technik analityczno-diagnostycznych, które odnosiły się zarówno do metod obrazowania powierzchni, analizy składu chemicznego, określenia struktury i właściwości fizykochemicznych, chemicznych wytworzonych materiałów. Pewne zastrzeżenie budzi jedynie fakt, że Doktorantka nie

zdecydowała się w swojej pracy na zastosowanie technik związanych z analizą powierzchni nanoporowatych warstw np. metodą spektroskopii fotoelektronów, wówczas informacja o stanie chemicznym powierzchni takich materiałów byłaby zdecydowanie bardziej bogata, gdyż pełni ona kluczową rolę w aplikacjach medycznych. Za mniej celowe uważam zamieszczenie w pracy wyników badań korozyjnych – krzywe polaryzacji, na podstawie których Autorka określiła charakterystyczne parametry jak potencjał korozyjny, gęstość prądu korozyjnego, opór korozji, szybkość korozji w $\mu\text{m}/\text{rok}$. Tak duża rozbieżność wyników korozyjnych prawdopodobnie wynika z nietypowej morfologii oraz stopnia zanieczyszczenia powierzchni nanorurek bezpośrednio po procesie anodyzacji, być może lepszym krokiem byłoby zbadanie efektu korozyjnego po procesie wygrzewania, kiedy struktura materiału jest zdecydowanie bardziej stabilna. Zamiast wyników korozyjnych lepszym testem wydaje się być sprawdzenie biostabilności w czasie nanoporowatych struktur TiO_2 w sztucznych płynach ustrojowych jak np. SBF.

Podsumowując tą część pracy w wyniku przeprowadzonych badań własnych Doktorantka wywiązała się z postawionych celów pracy sformułowanych w rozdziale trzecim. Pani mgr. Magdalena Jarosz wykazała, że metodą utleniania anodowego możliwe jest wytworzenie nanoporowatych warstw o różnej wielkości porów – zakres od 65 do 130 nm. Ponadto wykazała, że wszystkie badane próbki zarówno przed jak i po procesie wygrzewania spełniały warunek hydrofilowości – co jest istotne ze względu na proponowaną aplikację wytworzonych warstw. Oprócz zaobserwowanej zmiany w zwilżalności powierzchni po wygrzewaniu, Autorka potwierdziła, że pod wpływem temperatury zachodzi przemiana polimorficzna tlenku tytanu z formy amorficznej w krystaliczną – anataz w temp. 400°C , rutil w temp. 800°C , lecz wygrzewanie w wyższych temperaturach powyżej 700°C powoduje zniszczenie struktury nanoporowatej. Ponadto udowodniła, że pod wpływem modyfikacji powierzchni otrzymanych nanostruktur przez depozycję nanocząstek Ag i wprowadzenie leków w pory można zdecydowanie poprawić ich właściwości antybakteryjne w stosunku do niemodyfikowanych warstw, najbardziej pozytywny efekt uzyskano dla nanocząstek otrzymanych metodą redukcji chemicznej z zastosowaniem cytrynianu sodu oraz dla gentamycyny. Próbki wzbogacone antybiotykiem wykazały działanie bakteriobójcze w stosunku do dwóch testowanych szczepów bakterii zarówno po 48, jak i 120 h eksperymentu, należy zaznaczyć, że efekt dla nanocząstek Ag był gorszy. Na podstawie badań odpowiedzi komórkowej Doktorantka stwierdziła, że komórki linii MG-63 lepiej namnażają się i przyłączają do materiałów nanoporowatych niż do powierzchni czystego tytanu. Pewnym

zaskoczeniem jest, że najkorzystniejsze do hodowli komórkowej okazały się warstwy o strukturze amorficznej niezależnie od średnicy porów - brak istotnego wpływu zmiany struktury i zwilżalności. Ponadto Autorka nie zaobserwowała ścisłej korelacji pomiędzy ilością przyłączonych komórek do powierzchni a napięciem anodyzacji, co wpisuje się w aktualne doniesienia literaturowe, w których można znaleźć sprzeczne informacje dotyczące wpływu wielkości porów na proliferację komórek, ten problem nie został do tej pory rozstrzygnięty.

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki badań, chcę podkreślić główne zalety recenzowanej pracy:

- próba powiązania czynników morfologicznych, składu chemicznego, struktury materiału, zwilżalności powierzchni wytworzonych warstw tlenkowych z ich odpowiedzią biologiczną (testy komórkowe, antybakteryjne),
- zaproponowanie mechanizmu przejścia fazowego anataz-rutyl w nanoporowatych warstwach tlenku tytanu, kluczowe były wyniki dyfrakcji niskokątowej,
- określenie kinetyki uwalniania dwóch rodzajów leków: ibuprofenu, gentamycyny z nanoporowatych warstw oraz zaproponowanie nowego modelu matematycznego opisującego proces uwalniania, który postępuje w kontrolowany sposób, co jest kluczowe w sytuacjach zakażeń bakteryjnych.

Uwagi krytyczne

Przedłożoną pracę oceniam pozytywnie w kategoriach merytorycznych. Tym niemniej chciałbym zwrócić uwagę na pewne nieścisłości oraz wątpliwości, które pojawiły się w pracy.


- Strona 8."Tytan należy do materiałów inertnych, a więc nie jest możliwe bezpośrednie połączenie go z kością".....Wydaje się, że Autorka pracy w tym miejscu zastosowała pewien skrót myślowy, w literaturze można znaleźć publikacje, które zaprzeczają temu stwierdzeniu, prace Branemarka, Journal of Rehabilitation Research and Development Vol. 38 No. 2, March/April 2001, Pages 175–181

- Strona 30....."Komercyjnie czysty tytan nie posiada zdolności łączenia się z tkanką kostną, proces ten zachodzi poprzez wytworzenie się na powierzchni tytanu tlenku tytanu (IV)".....Jaki jest wpływ warstwy pasywnej na Ti na biogodność czystego tytanu?

- Strona 36 – do badań użyto mikroskop elektronowy FE-SEM/EDS, Hitachi S-4700 z systemem Noran 7, czy system Noran 7 odnosi się do spektrometru z dyspersją energii promieniowania rentgenowskiego, EDS?
- Dlaczego Doktorantka stosowała aż 3 h polaryzacji anodowej w pierwszym i drugim etapie formowania warstw, czy krótsze czasy nie byłyby wystarczające do otrzymania preteksturowanej folii tytanowej?
- Strona 47, w przypadku pomiaru kąta zwilżania raczej powinno stosować się pojęcie rozkładu kropli na powierzchni, niż kąt zwilżania pomiędzy kroplą a powierzchnią.
- Strona 55, ...”Wygrzewanie anodowego tlenku tytanu(IV) ma również za zadanie usunięcie jonów fluorkowych, które mogą toksycznie działać na komórki”.. Czy Autorka próbowała znaleźć jakieś korelacje pomiędzy zanieczyszczeniami pochodzącymi z elektrolitu a odpowiedzią komórkową wytworzonych materiałów?
- Strona 56, na rysunku 27 przedstawiono widma EDS, dlaczego na widmie dla próbki amorficzny TiO_2 brak jest sygnału od O ($\text{O}_{\text{K}\alpha}$ - 0,523 keV) i F ($\text{F}_{\text{K}\alpha}$ - 0,677 keV)? W jaki sposób wyznaczono stężenie F w próbce jeśli różnica energii pomiędzy sygnałami O i F wynosi około 150 eV (granica rozdzielczości spektrometru EDS)?
- Strona 56, co doktorantka miała na myśli, że przy wyższych temperaturach substrat tytanowy staje się bardziej kruchy.
- Strona 63, co jest przyczyną spadku udziału anatazu w warstwie po wygrzewaniu w temp. 800°C do zera, a potem obserwujemy wzrost przy 900°C, rysunek 31.
- Próbki wzbogacone antybiotykiem wykazały działanie bakteriobójcze w stosunku do dwóch testowanych szczepów bakterii po krótszym i dłuższym czasie, takiego znaczącego efektu nie zaobserwowano dla nanocząstek Ag? Czy Doktorantka mogłaby skomentować ten wynik uwzględniając takie właściwości nanocząstek jak ich rozmiar, kształt, ilość, stopień zanieczyszczenia powierzchni – proces chemiczny otrzymywania nanocząstek? Czy sam nanoporowaty tlenek tytanu wykazuje jakieś właściwości antibakteryjne?

Opinia końcowa

Podsumowując uważam, że cele rozprawy doktorskiej Pani mgr. Magdaleny Jarosz zostały w pełni zrealizowane. Powyższe uwagi oraz pewne niejasności nie mają wpływu na moja pozytywną opinię o całości pracy, która została wykonana przy dużym nakładzie pracy, a Autorka wykazała się w tym względzie należyłą kompetencją. Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Magdaleny Jarosz „Nanoporowaty anodowy tlenek tytanu (IV) jako materiał na implanty kości” stwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymagania wynikające z „Ustawy o stopniach i tytułach naukowych” i wnoszę o dopuszczenie doktorantki do publicznej dyskusji nad rozprawą.



Dr hab. inż. Marcin Pisarek