



Politechnika Koszalińska

WYDZIAŁ MECHANICZNY

Raławicka 15-17, 75-620 Koszalin, tel. (+48) 94 342-78-81, (+48) 94 347-83-99, fax. (+48) 94 342-67-53, (+48) 94 347-83-92

Dr hab. inż. Krzysztof Rokosz, Prof. nzw. PK

Zespół Badawczo-Dydaktyczny Bioinżynierii i Elektrochemii Powierzchni
Katedra Inżynierii Systemów Technicznych i Informatycznych
Wydział Mechaniczny, Politechnika Koszalińska
ul. Raławicka 15-17, PL 75-620 Koszalin
tel. 94 3478 354, e-mail: rokosz@tu.koszalin.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Anny Pawlik

pt. "MODYFIKOWANE NANOPOROWATE WARSTWY ANODOWEGO TLENKU TYTANU(IV) – CHARAKTERYSTYKA I ZASTOSOWANIA BIOMEDYCZNE"

Podstawę opracowania recenzji stanowi pismo Prodziekana ds. ogólnych Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego dr hab. Jolanty Kochanej, prof. z dnia 17 lipca 2019. Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska pod tytułem "MODYFIKOWANE NANOPOROWATE WARSTWY ANODOWEGO TLENKU TYTANU(IV) – CHARAKTERYSTYKA I ZASTOSOWANIA BIOMEDYCZNE" przygotowana przez mgr Annę Pawlik. Promotorem rozprawy doktorskiej jest prof. dr hab. Grzegorz D. Sulka.

Zastosowanie biomateriałów w rekonstrukcji kości oraz stomatologii w obecnym czasie jest coraz bardziej powszechne. Zastosowanie nowych biomateriałów lub obróbka tych już istniejących ma na celu przede wszystkim zwiększenia ich biokompatybilności i zmniejszenie ryzyka reoperacji, a co za tym idzie zwiększenie komfortu życia potencjalnego pacjenta. W ocenianej rozprawie doktorskiej podjęto się zadania modyfikacji nanoporowatych warstw tlenku tytanu(IV) (TiO_2) otrzymanych w procesie anodyzacji oraz modyfikowanych wodorotlenkiem sodu (NaOH), jak i pochodnymi silanu różniącymi się grupami funkcyjnymi

((3-aminopropyl)trietyloksy-silanem (APTES), (3-glicydyloksypropyl)trimetoksy-silanem (GPTMS) oraz (3-merkaptopropyl)trimetoksy-silanem (MPTMS)). Należy zaznaczyć, że zbadano również wpływ modyfikacji na proces uwalniania leków oraz na interakcję z komórkami osteoblastopodobnymi, a także określono bioaktywność takich podłoży. Dodatkowo anodowe warstwy tlenku tytanu(IV) pokryto kompozytem hydroksyapatytu i chitozanu w procesie osadzania elektroforetycznego, celem zwiększenia ich biokompatybilności.

Przygotowana rozprawa doktorska o objętości 206 stron, zawierająca 70 rysunki, 35 tabel oraz 138 pozycje literaturowe oraz 257 pozycji literaturowych, została podzielona na dziewięć rozdziałów w tym streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz trzy załączniki z publikacjami.

Praca zaczyna się od praktycznie stronicowego rozdziału pierwszego, w którym Autorka rozprawy doktorskiej podaje podstawowe informacje związane z endoprotezoplastykami stawów oraz biokompatybilnością tlenku tytanu(IV). W rozdziale drugim opisano zarówno biomateriały i implanty medyczne, jak i nanostruktury tlenku tytanu(IV) z uwzględnieniem ich właściwości, zastosowania, metod otrzymywania, modyfikacji, elektroforetycznego osadzania hydroksyapatyt oraz podano informacje związane z nośnikami leków, bioaktywnością materiałów implantologicznych i rusztowaniami do hodowli komórkowej. W rozdziale trzecim zaprezentowano cele i hipotezy badawcze pracy doktorskiej, co oceniam pozytywnie. W kolejnym (czwartym) rozdziale Doktorantka skupia się na opisie metodyki, po czym płynnie przechodzi do prezentacji otrzymanych wyników pomiarowych komentując je na bieżąco, co pozwala czytelnikowi w pełni zrozumieć tok rozumowania przyjęty przez Autorkę pracy. Na wyróżnienie zasługuje fakt, że do charakterystyki otrzymanych powierzchni Doktorantka używa dobrze dobranych i uzupełniających się metod pomiarowych, takich jak SEM, EDS, XPS, XRD, FTIR, pomiar kąta zwilżalności oraz chropowatości powierzchni. Jednakże dyskusyjne jest w przypadku tlenu dla wyników EDS przedstawianie tak dużej dokładności wynikającej z obróbki statystycznej danych pomiarowych. Oczekiwałoby się chociażby minimalnego komentarza, że ten wynik może być obarczony dużo większym błędem niż odchylenie statystyczne. Poza tym Doktorantka mogła się pokusić o analizę niepewności pomiarów typu A i B, co by w pełni wyjaśniło powyższy problem. W przypadku danych XPS dokładność do dwóch

miejsce po przecinku na podstawie widm przeglądowych wydaje się zbyt duża. Dodatkowo zastanowiłbym się w przypadku kolejnych prac naukowych, czy nie byłoby rozsądne dodatkowo wytrawić w próżni powierzchni przed badaniem XPS, co pomogłoby usunąć zanieczyszczenia i pozwoliłoby na lepszą interpretację ilościową i jakościową głównie ze względu na węgiel i tlen. Innym niedociągnięciem jest niepodanie dokładnie jaki parametr chropowatości 2D został wybrany do analizy chropowatości powierzchni. Doktorantka podaje jedynie, że jest to parametr „R”, co nie jest jednoznaczne, gdyż daje to czytelnikowi bardzo dużo niejednoznacznych możliwości wyboru. Najprawdopodobniej został wzięty jeden z parametrów najczęściej używanych do oceny chropowatości powierzchni, tj. albo Ra, albo Rz. Należy również rozważyć w dalszych badaniach zastosowanie parametrów 3D do charakterystyki chropowatości powierzchni. Do pozostałych opisów danych pomiarowych oraz ich interpretacji nie mam zastrzeżeń. Chciałbym jednocześnie zaznaczyć, że opisane powyżej potknięcia na tym etapie rozwoju naukowego Doktorantki są usterkami, które w przyszłości powinny być wzięte pod uwagę, jednakże nie umniejszają jakości ocenianej rozprawy doktorskiej. Na szczególne wyróżnienie moim zdaniem zasługują badania biologiczne, co od Doktorantki wymagało nabycia dodatkowej wiedzy, co również świadczy o dużej Jej determinacji do przygotowania w pełni interdyscyplinarnej pracy. Istotnym jest również fakt, że Autorka rozprawy doktorskiej definiuje dalsze perspektywy badań, co daje możliwości w najbliższej przyszłości pracy w zespołach interdyscyplinarnych oraz w rezultacie na wdrożenie otrzymanych wyników. W rozdziałach od piątego do dziewiątego zostały zaprezentowane podsumowanie, spis publikacji i staży naukowych, podziękowani, literatura i załączniki, do czego nie mam zastrzeżeń.

Moim zdaniem treść rozprawy stanowi zamkniętą całość, a postawione cele zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa jest napisana poprawnym językiem i posiada starannie opracowaną szatę graficzną oraz stojącą na bardzo wysokim poziomie dokumentację z badań własnych. Czasopisma naukowe, w których zostały opublikowane poszczególne części pracy są tematycznie zgodne z zagadnieniami prezentowanymi w doktoracie. Należy zaznaczyć, że prace opublikowane w w/w czasopismach zostały już zrecenzowane i ocenione pozytywnie. Po zapoznaniu się z tym pracami również oceniam je jako bardzo dobre. Według mnie przedstawiona rozprawa doktorska jest bardzo wartościowa i na pewno stanowi podstawę do dalszych badań naukowych zarówno dla Doktoranta jak i innych badaczy.

Reasumując należy zaznaczyć, że do istotnych osiągnięć Doktoranta należą:

- Wykazano, że modyfikacja jedynie amorficznych warstw TiO_2 spowodowało zmianę morfologii powierzchni.
- Wykazano, że iż wydłużenie czasu zanurzenia próbek w NaOH oraz zwiększenie stężenia roztworu wodorotlenku sodu prowadzi do destrukcji nanoporowatej struktury.
- Wykazano, że wygrzewanie tlenku tytanu(IV) po modyfikacji NaOH nie powoduje zniszczenia nanoporów lub usunięcia sodu.
- Wykazano, że funkcjonalizacja warstw TiO_2 w roztworze wodorotlenku sodu o stężeniu $0,5 \text{ mol/dm}^3$ przez 15 min, a następnie, opcjonalnie, ich wygrzewanie w temperaturze $400 \text{ }^\circ\text{C}$ było optymalne w kontekście funkcjonalizacji trzema pochodnymi silanu: (3-aminopropyl)trietoksysilanu (APTES), (3-glicydyloksypropyl)trimetoksysilanu (GPTMS) i (3-merkaptopropyl)trimetoksysilanu (MPTMS).
- Wykazano, że dla każdej modyfikacji na powierzchni pojawił się krzem oraz w przypadku APTES – również azot, a MPTMS – siarka, czyli pierwiastki występujące w grupach funkcyjnych tych cząsteczek.
- Wykazano, że zarówno obróbka termiczna, jak i funkcjonalizacja powierzchni skutkuje zwiększeniem hydrofilowości podłoża, co poprawia adhezję komórek.
- Wykazano, że można zastosować technikę osadzania elektroforetycznego do uzyskania pokrycia kompozytowego hydroksyapatytu i chitozanu na warstwach TiO_2 o strukturze anatazu.
- Wykazano, że obecność kompozytu na nanostrukturach anatazu zwiększa chropowatość powierzchni bez pogorszenia ich hydrofilowości, co powinno polepszyć odpowiedź komórkową biomateriału z powodu zwiększenia powierzchni kontaktu między komórką a podłożem.
- Wykazano, że procedura GI, polegająca najpierw na wprowadzeniu gentamycyny, a potem ibuprofenu, pozwala na spowolnienie przechodzenia do roztworu antybiotyku tuż po zanurzeniu nośnika w buforze fosforanowym, co w efekcie zmniejszyłoby to ryzyko przekroczenia jego poziomu toksyczności w ciele pacjenta.

- Wykazano, że zastosowanie głębszych nanoporów o strukturze anatazu prowadzi również do spadku ilości gentamycyny dostarczonej w trakcie początkowego, gwałtownego wyrzutu substancji.
- Wykazano, że modyfikowane amorficzne warstwy TiO_2 charakteryzowały się spowolnieniem dostarczania ibuprofenu w porównaniu z niemodyfikowanymi próbkami, co ma swoje odzwierciedlenie w wartościach parametrów modelu DDD, a zwłaszcza f_1 i k_1 , które opisywały proces desorpcji cząsteczek z powierzchni.
- Wykazano, że wyraźna zmiana w wyglądzie profilu uwalniania była spowodowana modyfikacją wodorotlenkiem sodu, a dalsza funkcjonalizacja powierzchni nie powodowała zauważalnych różnic w kinetyce procesu, czego nie zaobserwowano dla wygrzewanych próbek
- Wykazano, że Modyfikacja powierzchniowa nie odgrywa roli w procesie uwalniania ibuprofenu.
- Wykazano, że w przypadku gentamycyny nie zaobserwowano wpływu sposobu funkcjonalizacji próbek na uzyskane profile.
- Wykazano, że prawie cała ilość wprowadzonej gentamycyny została uwolniona podczas początkowego wyrzutu leku, a szybkość desorpcji antybiotyku z powierzchni nośnika była większa niż ibuprofenu, co najprawdopodobniej mogło być związane z lepszą rozpuszczalnością gentamycyny w wodzie.
- Wykazano, że jedynie warstwy TiO_2 o strukturze anatazu oraz mieszaniny anatazu i rutyłu stymulują proces krystalizacji apatytu.
- Wykazano, że zastosowane modyfikacje powierzchniowe amorficznych próbek polepszają ich bioaktywność w stosunku do niemodyfikowanych podłoży, aczkolwiek nie tak dobrze jak obróbka termiczna.
- Wykazano, że dla obu linii komórkowych różniących się fenotypem (SAOS-2 i MG-63) stwierdzono korzystny wpływ modyfikacji aminową pochodną silanu (APTES), co świadczy o tym, że taki sposób funkcjonalizacji podłoża poprawia jego interakcję z komórkami o fenotypie dojrzałych (SAOS-2) i niedojrzałych (MG-63) osteoblastów.
- Wykazano, że funkcjonalizacja zarówno amorficznych, jak i wygrzewanych warstw TiO_2 za pomocą GPTMS zwiększa aktywność metaboliczną komórek w stosunku do niemodyfikowanych nanostruktur tlenku tytanu(IV).

- Wykazano, że na wszystkich rodzajach próbek po 2 godzinach komórki (SAOS-2 i MG-63) były raczej okrągłe, ale po 24-godzinnej inkubacji doszło do ich rozplaszczenia.
- Wykazano, że komórki SAOS-2 i MG-63 mają dobrą adhezję do warstw TiO_2 , o czym świadczyła obecność filopodiów na mikrofotografiach SEM oraz winkuliny na zdjęciach z mikroskopu fluorescencyjnego.
- Wykazano, że przy braku płodowej surowicy bydłowej w medium hodowlanym zachowanie komórek linii SAOS-2 nie zależało od funkcjonalizacji powierzchni.
- Wykazano, że modyfikacja warstw TiO_2 za pomocą GPTMS lub APTES powoduje poprawę adhezji i proliferacji komórek osteoblastopodobnych linii MG-63 zarówno w przypadku niewygrzewanych, jak i wygrzewanych próbek.
- Wykazano, że modyfikacja warstw TiO_2 pochodną silanu oraz wodorotlenkiem sodu jest korzystna ze względu na poprawę odpowiedzi komórkowej tak obrabianego podłoża, pomimo spowolnienia proces uwalniania ibuprofenu, jednakże bez wpływu na kinetykę dostarczania gentamycyny.

Należy zaznaczyć, że Doktorantka była kierownikiem w 2 projektach naukowych (Preludium i Etiuda), występowała na 39 konferencjach naukowych. Jej dane bibliograficzne (indeks Hirscha: 5, sumaryczny IF: 38,373, liczba publikacji w JCR: 9, całkowita liczba cytowani: 93) są na bardzo wysokim poziomie, co należy uznać za ponadprzeciętne na wiek Doktorantki. Na wyróżnienie zasługuje również osiągnięcie, którym jest współautorstwo 9 publikacji naukowych, zaprezentowanych poniżej, które są odnotowane na Web of Science, co jest wynikiem wyróżniającym i ponadprzeciętnym.

1. **A. Pawlik**, M.A.U. Rehman, Q. Nawaz, F.E. Bastan, G.D. Sulka, A.R. Boccaccini, Fabrication and characterization of electrophoretically deposited chitosan-hydroxyapatite composite coatings on anodic titanium dioxide layers, *Electrochim. Acta* 307 (2019) 465-473 (IF = 5,383).
2. **A. Pawlik**, R.P. Socha, M. Hubalek-Kalbacova, G.D. Sulka, Surface modification of nanoporous anodic titanium dioxide layers for drug delivery systems and enhanced SAOS-2 cell response, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 171 (2018) 58-66 (IF = 3,973).
3. **A. Pawlik**, M. Jarosz, K. Syrek, G.D. Sulka, Co-delivery of ibuprofen and gentamicin from nanoporous anodic titanium dioxide layers, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 152 (2017) 95-102 (IF = 3,973).

4. **A. Pawlik**, K. Hnida, R.P. Socha, E. Wiercigroch, K. Małek, G.D. Sulka, Effects of anodizing conditions and annealing temperature on the morphology and crystalline structure of anodic oxide layers grown on iron, *Appl. Surf. Sci.* 426 (2017) 1084–1093 (IF = 5,155).
5. J. Kapusta-Kołodziej, K. Syrek, **A. Pawlik**, M. Jarosz, O. Tynkevych, G.D. Sulka, Effects of anodizing potential and temperature on the growth of anodic TiO₂ and its photoelectrochemical properties, *Appl. Surf. Sci.* 396 (2017) 1119–1129 (IF = 5,155).
6. M. Jarosz, **A. Pawlik**, M. Szuwarzyński, M. Jaskuła, G.D. Sulka, Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: drug release kinetics and mechanism, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 143 (2016) 447–454 (IF = 3,973).
7. J. Kapusta-Kołodziej, O. Tynkevych, **A. Pawlik**, M. Jarosz, J. Mech, G.D. Sulka, Electrochemical growth of porous titanium dioxide in a glycerol-based electrolyte at different temperatures, *Electrochim. Acta* 144 (2014) 127–135 (IF = 5,383).
8. M. Jarosz, **A. Pawlik**, J. Kapusta-Kołodziej, M. Jaskuła, G.D. Sulka, Effect of the previous usage of electrolyte on growth of anodic titanium dioxide (ATO) in a glycerol-based electrolyte, *Electrochim. Acta* 136 (2014) 412–421 (IF = 5,383).
9. M. Jarosz, J. Kapusta-Kołodziej, **A. Pawlik**, K. Syrek, G.D. Sulka, Drug delivery systems based on titania nanostructures, in: *Nanostructures in Therapeutic Medicine*, A.M. Grumezescu (Ed.), Elsevier 2017.

Istotnym jest również fakt, że Doktorantka brała udział w trzech stażach naukowych: na Uniwersytecie Karola w Pradze (Czechy, 2 miesiące), Uniwersytecie Friedricha Alexandra Erlangen-Norymberga (Niemcy, 1 miesiąc), na Uniwersytecie w Oslo (Norwegia, 4 miesiące). Dodatkowo należy zaznaczyć, że Doktorantka została wyróżniona nagrodami za opublikowanie w 2018 roku artykułu naukowego w czasopiśmie o najwyższym impact factorze, za prezentację posterową podczas konferencji 5th International Symposium on Surface Imaging/Spectroscopy at the Solid/Liquid Interface oraz zajęła drugie miejsce w sesji nauk farmaceutycznych podczas VI Konferencji Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska "MODYFIKOWANE NANOPOROWATE WARSTWY ANODOWEGO TLENKU TYTANU(IV) – CHARAKTERYSTYKA I ZASTOSOWANIA BIOMEDYCZNE" przygotowana przez mgr Anny Pawlik pod opieką prof. dr hab. Grzegorza D. Sulki spełnia

w mojej opinii wymogi ustawy "o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki", w związku z czym wnioskuję o dopuszczenie jej do publicznej obrony przed Radą Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Chciałbym jednocześnie zaznaczyć, że złożoność rozwiązanego problemu naukowego, szeroki, dobrze zaplanowany zakres badań, rzetelność w jego realizacji oraz liczący się dorobek naukowy są podstawą do wyróżnienia tej pracy.



Koszalin, 12.08.2019

Dr hab. inż. Krzysztof Rokosz, Prof. nzw. PK

POLITECHNIKA KOSZALIŃSKA
WYDZIAŁ MECHANICZNY
75-620 Koszalin, ul. Raclawicka 15-17
tel. 94 347 84 37 fax 94 342 67 53