

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Pawlik

pt.: **“Modyfikowane nanoporowate warstwy anodowego tlenku tytanu (IV) – charakterystyka i zastosowanie biomedyczne”**

opracowana na zlecenie Dziekana Wydziału Chemii,

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

1. Tematyka rozprawy

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy problematyki materiałów dla medycyny w szczególności dla implantologii. Postępujące starzenie społeczeństwa oraz coraz większa liczba zachorowań na choroby cywilizacyjne tj. cukrzyca, nadwaga, choroby układu krążenia i układu szkieletowo-mięśniowego oraz nowotwory, wpływają na wzrastające zapotrzebowanie na nowe produkty medyczne i metody leczenia. Jako efekt narastającej liczby przypadków zmian chorobowych stawów tj. zmiany zwyrodnieniowe i reumatoidalne, na świecie każdego roku wykonuje się więcej niż milion operacji alloplastyk polegających na zastąpieniu chorego stawu endoprotezą w celu usunięcia bólu oraz przywrócenia funkcjonalności stawu pacjenta. Na przykład według danych statystycznych, rocznie w USA implantuje się około 90 tysięcy protez stawu biodrowego, 65 tysięcy protez stawu kolanowego i 50 tysięcy protez kończyn górnych (barku, łokcia, nadgarstka, palców). Natomiast w Polsce roczne

zapotrzebowanie na endoprotezy stawu wynosi około 100 tysięcy. Przewiduje się, że liczby te będą znacząco rosnąć w kolejnych latach.

Mimo stosowania szerokiej gamy implantów o dużej trwałości, potwierdzonej w badaniach *in vitro*, żaden z nich nie gwarantuje w pełni przywrócenia stanu pełnego zdrowia pacjenta. Chociaż większość obecnie stosowanych endoprotez może funkcjonować przez wiele lat w organizmie bez konieczności wymiany, ich wymiana jest i tak w końcu nieunikniona. Dla przykładu, endoprotezy stawu biodrowego mogą funkcjonować średnio od 15 do 20 lat, chociaż czasami występuje konieczność przeprowadzenia operacji rewizyjnej nawet już po kilku dniach funkcjonowania protezy. Bezpośrednią przyczyną tej interwencji chirurgicznej, która polega na wymianie komponentu lub całkowitym zastąpieniu protezy pierwotnej protezą rewizyjną, jest zwiększający się ból oraz utrata czynności ruchowych stawu pacjenta, spowodowane głównie przez obłuzowanie się implantów oraz ich zużyciu. Dlatego ciągle poszukuje się nowych rozwiązań materiałowych na elementy endoprotez. Wśród kierunków badawczych można wyróżnić dwa główne: i) projektowanie materiałów o wysokiej odporności korozyjnej, dużej wytrzymałości mechanicznej oraz sztywności zbliżonej do tkanki kostnej, ii) modyfikacja powierzchni implantów w celu poprawy osteointegracji – bio-mocowania implantów w tkance kostnej. Pierwszy kierunek badań koncentruje się nad nowymi materiałami tytanowymi wysokiej biogodności i module Younga zbliżonym do kości – np. stopu z układu Ti – Nb – Ta – Zr. Jeżeli chodzi o drugi kierunek badań wiąże się on z modyfikacją powierzchni materiałów implantacyjnych w celu uzyskania bioaktywnych warstw, sprzyjających adhezji, migracji i proliferacji komórek kostnych. Spowodują bezpośrednio narastanie tkanki kostnej na implancie i trwałe jego zamocowanie w kości. Do metod modyfikacji powierzchni można zaliczyć metody mechaniczne (obróbka mechaniczna), fizyczne (np. PVD, implantacja jonów), chemiczne (np. CVD) i biochemiczne (np. immobilizacja białek). Do najbardziej popularnych należy nakładanie na powierzchnię implantu hydroksyapatytu (HAp) – bioceramiki wchodzącej w skład naturalnej kości. Niestety występujące problemy z adhezją HAp do podłoża tytanowego skłoniło do poszukiwania innych metod modyfikacji. Jednym z obiecujących kierunków badań jest pokrycie tytanu i jego stopów tlenkiem tytanu (IV). Najskuteczniejszą metodą znaną i rozwijaną już od kilkadziesiąt lat jest elektrochemiczne utlenianie anodowe. Formowanie warstwy TiO_2 zależy od podłoża oraz warunków utleniania elektrochemicznego, takie jak rodzaj, stężenie i pH elektrolitu, zastosowany potencjał

i czas anodowania. Najwięcej prac jest o formowaniu tlenków na czystym tytanie. Przy odpowiednich warunkach procesu na powierzchni Ti mogą powstawać interesujące z punktu widzenia zastosowań w różnych obszarach techniki i medycyny nanoporowate struktury lub nanorurki zbudowane z TiO_2 . Jest wiele prac naukowych opisujących metody wytwarzania, modyfikacji oraz zastosowań nanoporowatych warstw tlenku tytanu (IV). Mogą one być użyte w ogniwach słonecznych, jako powierzchnie samoczyszczące lub superkondensatory. Nanostruktury TiO_2 wykazują duży potencjał jako biomateriały na implanty lub nośniki leków. TiO_2 charakteryzuje się dobrą biozgodnością oraz właściwościami bakteriobójczymi. Mimo licznych prac badawczych nadal brakuje wiedzy na temat optymalnej nanotopografii, struktury i składu chemicznego warstw na implantach tytanowych, które spowodują właściwą odpowiedź komórkową i powstanie trwałego bio-połączenia kości z implantem. Ponadto konieczne są dalsze badania prowadzące do modyfikacji powierzchni nanostruktur TiO_2 w celu nadania im cech nośników leków o pożądanej kinetyce uwalniania do organizmu, lokalnie do miejsca leczenia, jednego lub kilku substancji biologicznie czynnych – np. antybiotyków.

Badania prowadzone przez Panią mgr Annę Pawlik, pod kierunkiem Profesora Grzegorza Sulki, eksperta światowego w obszarze anodowych warstw tlenkowych, koncentrują się nad modyfikacją chemiczną i funkcjonalizacją opracowanych w zespole Profesora Sulki nanoporowatych warstw TiO_2 w celu poprawy interakcji z komórkami kostnymi oraz kontroli uwalniania leków.

W świetle tych rozważań można stwierdzić, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej jest aktualna i bardzo dobrze wpisuje się w nowe trendy naukowe związane z rozwojem nanostruktur tlenku tytanu (IV), których celem jest wytwarzanie bioaktywnych warstw na implantach kostnych.

2. Struktura, cel i zakres pracy

Rozprawa doktorska Pani Anny Pawlik napisana jest w języku polskim. Język i układ rozprawy są poprawne. Opracowanie przedstawione do recenzji jest obszerne i liczy wraz z załącznikami 206 stron. Składa się z 5 głównych rozdziałów (*Wstęp, Część Literaturowa, Cele i Hipotezy Badawcze, Część Doświadczalna, Podsumowanie*), które są podzielone na podrozdziały. Pierwszy rozdział – Wstęp – zwięźle wprowadza czytelnika w tematykę pracy i w dużym skrócie uzasadnia podjęcie badań opisanych

w dalszej części pracy. Licząca 40 stron część literaturowa stanowi dobrze przygotowany opis stanu zagadania w obszarze biomateriałów, nanostruktur tlenku tytanu (IV), ich modyfikacji powierzchni, nośników leków wraz modelami matematycznymi opisującymi kinetykę ich uwalniania, oraz podłoży do hodowli komórek i badań komórkowych. Autorka w sposób właściwy i dojrzały przeanalizowała stan wiedzy w przedmiocie rozprawy, korzystając z wielu źródeł literatury światowej. Mimo szczegółowego i merytorycznego opisu różnych metod modyfikacji powierzchni oraz tworzeniu warstw anodowych tlenków tytanu na czystym tytanie w części literaturowej zabrakło informacji możliwości tworzenia takich warstw na stopach implantacyjnych, które obecnie najczęściej stosowane są jako materiały na implanty kostne, np. Ti6Al4V. W tej części pracy brakuje także wyraźniejszego podkreślenia jakie są wady obecnie stosowanych rozwiązań materiałowych i jakich rozwiązań brakuje. Mogłoby to stanowić dobre uzasadnienie (motywację) podjęcia zaplanowanych w pracy badań.

Na kolejnych dwóch stronach Dyplomantka formułuje hipotezę główną i 6 hipotez szczegółowych, które stanowią o naukowym i nowatorskim charakterze pracy. Ponadto podaje 7 celów pracy. W rozdziale tym zabrakło opisu zakresu badań zrealizowanych w ramach prac doktorskiej.

Badania własne opisane są w części doświadczalnej, która liczy 108 stron. Jest to najobszerniejszy fragment rozprawy, który został podzielony na 3 główne podrozdziały. Główne podrozdziały to: *Otrzymywanie i modyfikacja nanoporowatych warstw TiO₂*, *Uwalnianie leków*, oraz *Badania komórkowe*. Każdy z tych podrozdziałów zawiera opisy zrealizowanych w danej tematyce zadań badawczych, ściśle powiązanych z celami pracy. Opisy zadań badawczych obejmują krótkie wprowadzenie, charakterystykę użytych materiałów i odczynników chemicznych, metodykę, wyniki wraz z dyskusją. W większości przypadków swoje stwierdzenia Doktorantka podpira poprawnie przeprowadzoną analizą statystyczną. Każdy z podrozdziałów zakończony jest podsumowaniem i wnioskami.

W ostatnim rozdziale rozprawy Pani mgr Pawlik w sposób syntetyczny podsumowuje uzyskane wyniki, wymienia najważniejsze według niej osiągnięcia pracy oraz nakreśla perspektywy dotyczące przyszłych kierunków badań w obszarze nanoporowatych warstw TiO₂.

Rozprawa zakończona jest bogatą bibliografią, zawierającą 257 pozycji literaturowych. Są wśród nich artykuły naukowe, książki, prace dyplomowe i doktorskie, strony

internetowe. Użycie w pracy tak licznych odniesień do wyników prac już opublikowanych świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Pracę kończą 3 załączniki, które stanowią integralną część z opisem wybranych zadań badawczych i zestawia dodatkowe wyniki, np. związane z optymalizacją parametrów procesów modyfikacji lub analizą statystyczną wyników badań komórkowych.

Rozprawa jest przygotowany z dużą starannością. Jej układ, użyty język, słownictwo i terminologia są poprawne. Jest wzbogacona licznymi ilustracjami, przeważnie dobrej jakości, wykresami i tabelami co podnosi czytelność przygotowanego opracowania. Do uwag krytycznych można zliczyć wielokrotne używanie przez Dyplomantka słów „matryca” zamiast „osnowa”, „materiały implantologiczne” zamiast „materiały implantacyjne”, „istotnie statystyczny” zamiast „statystycznie istotny”, natomiast zamiast „formazan” związek podpisano „formazon”. Ponadto część rysunków zamieszczonych w pracy zostało opublikowanych wcześniej z artykułach Pani Doktorantki i nie użyto przy opisie rysunków przywołać do tych publikacji. Przy opisie morfologii otrzymanych warstw dodatkowa analiza ilościowa podniosłaby jakość wyników (np. Rys.18). Na wykresach przedstawiających wyniki testu MTS (strona 149) brakuje wykresu przedstawiającego zmianę absorbancji w czasie, która pokazałaby ogólny trend zmian żywotności komórek. Przedstawione wyniki określają jedynie aktywność metaboliczną komórek w odniesieniu do kontroli w danym punkcie czasowym. Ponadto na stronie 152 brak jest wykresu zbiorczego, który przedstawiałby zmianę aktywności metabolicznej po 24 i 72 godzinach - utrudnia to dyskusję wpływu modyfikacji na odpowiedź komórkową.

3. Ocena merytoryczna i uwagi krytyczne

Wysoko oceniam wartość merytoryczną recenzowanej pracy, co zostało także potwierdzone 3 publikacjami Doktorantki opublikowanymi w wiodących czasopismach naukowych w dyscyplinie Chemia, powstałe ma postawie uzyskanych w pracy wyników. Pani Pawlik jest pierwszym autorem w tych publikacjach.

Tematyka rozprawy jest aktualna i ważna, zarówno z punktu widzenia zdobywania nowej wiedzy jak i praktycznego zastosowania wyników badań w medycynie.

Znakomicie wpisuje się w nowoczesne kierunki badań w obszarze biomateriałów, a w szczególności tematyce elektrochemicznych metod modyfikacji tytanu.

Bardzo ambitny program badań został w pełni zrealizowany. Użyta w pracy metodyka badań oraz przeprowadzona analiza wyników są poprawne. Pani Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną i praktyczną z zakresu wytwarzania i charakteryzowania nanoporowatych warstw TiO_2 na tytanie. Wielowątkowość podjętej tematyki badawczej wymagała od Doktorantki wykorzystania szeregu nowoczesnych metod i urządzeń badawczych tj. SEM, EDS, FTIR, XPS, XRD, badania bioaktywności, oraz badania komórkowe. Omawiając wyniki badań Pani mgr Pawlik zestawia je z danymi literaturowymi co świadczy o dużej dojrzałości naukowej i umiejętnościach Doktorantki w prowadzeniu dyskusji wyników badań i zasługuje na szczególną uwagę. Cele pracy zostały osiągnięte. Wyniki badań potwierdzają słuszność postawionej przez Doktorantkę hipotezy głównej oraz hipotez szczegółowych. Doktorantka wykazała, że modyfikacja powierzchni nanoporowatych warstw TiO_2 wodorotlenkiem sodu i pochodnymi silanu poprawia interakcję z komórek osteoblastopodobnych z badanymi podłożami, polepszy ich biogodność oraz zwiększy kontrolę nad procesem uwalniania modelowych leków (gentamycyna i ibuprofen). Autorka wykazała (co już zostało wykazane w wcześniejszych badaniach), że warstwy tlenku tytanu (IV) można modyfikować za pomocą wodorotlenku sodu i silanem, co znacząco wpływa na poprawę formowania się warstw apatytowych na podłożu tytanowy, w szczególności na próbkach o strukturze anatazu i anatazu/rutyku. Na uwagę zasługują wyniki badań prowadzące do modyfikacji TiO_2 warstwą kompozytową z hydroksyapatytu i chitozanu, przez co można także poprawić bioaktywność implantów. Istotnym osiągnięciem pracy było wykazanie, że funkcjonalizacja powierzchni, przede wszystkim silanami, poprawia odpowiedź komórkową. Komórki na modyfikowanych podłożach wykazywały lepszą adhezję, przeżywalność oraz proliferację. Do największych osiągnięć Doktorantki należy opracowanie nośników leków w postaci zmodyfikowanych warstw TiO_2 . Autorka poprzez zmianę struktury krystalicznej oraz właściwości chemicznych powierzchni była w stanie sterować w pewnym zakresie kinetyką uwalniania dwóch leków – gentamycyny i ibuprofenu. Na uwagę zasługuje również nowatorskie rozwiązanie polegające na jednoczesnym dostarczaniu obu leków z nanoporowatej warstwy anodowego tlenku tytanu (IV) po modyfikacji.

Czytając pracę nasuwają się pewne pytania i uwag:

- 1) W pracy brakuje informacji o stanie wyjściowym materiału tytanowego użytego w pracy, tj. czystość, mikrostruktura, etc. Jak stan materiału wyjściowego może wpłynąć na proces formowania warstw TiO₂?
- 2) Wyznaczenie zawartości procentowej O w próbce za pomocą EDS jest obarczone dużym błędem (np. Tab. 5, 6) – Czy EDS jest dobrą metodą do określania zawartości tlenu?
- 3) W podsumowaniu podrozdziału 4.1 Autorka pisze o powstaniu na powierzchni tytanianu sodu, nie potwierdzając tego wynikami badań.
- 4) W badaniach dotyczących nośników leków, brakuje założeń jaka powinna być kinetyka uwalniania leków oraz odniesienia się uzyskanych wyniki do tych założeń?
- 5) Skoro uzyskano ujemne wartości f₂ i KH dla gentamycyny dla systemu IG (str.108) może warto byłoby pomyśleć o przeanalizowaniu uwalniania z wykorzystaniem innego modelu matematycznego? Jakie są ograniczenia zastosowanego modelu?
- 6) Skoro nie oszacowano ilości wprowadzonych leków w procedurze I&G, zatem na jakiej podstawie wyliczono frakcję uwolnionego leku w poprzedniej części pracy 4.2.6.1. Z Tabela 13 wynika, że dla części układów (zwłaszcza zaznaczone na czerwono) frakcja uwolnionego leku nawet nie zbliżyła się do 1, co jest sprzeczne z danymi z wcześniej przedstawionych wykresów - jak to rozumieć?
- 7) W badaniach uwalnianie gentamycyny z modyfikowanych warstw TiO₂ zaplanowano zbadanie tylko amorficznych warstw TiO₂, tłumacząc, że wygrzewanie spowalnia uwalnianie GS. Ale przecież GS nie będzie w kontakcie z amorficzna lub krystaliczna strukturą TiO₂, a z silanem? Jeżeli badany był ibuprofen w obu układach i wynik dla APTES się zmienił, może dla gentamycyny zaobserwowano by podobną zależność?
- 8) Jak Autorka tłumaczy znacznie wyższą zawartość gentamycyny w układach modyfikowanych GPTMS i MPTMS? (tabela20) Dla porównywalnej wielkości nanoporów i powtarzalnej procedury wprowadzania leku, teoretycznie wartości te powinny być zbliżone. Ponieważ cały lek uwalniał się w ciągu ok 60s, ile wynosiła w wyliczeniach faza f₁?
- 9) Przy omawianiu adhezji metodami mikroskopowymi doktorantka słusznie zwraca uwagę na zjawisko adhezji białek na powierzchni biomateriałów. Jednak albumina wymieniona przez nią jako główny składnik FBS (co jest jak najbardziej poprawną

informacją) nie bierze udziału w adhezji komórek. Wręcz przeciwnie, Arima i Iwata zademonstrowali negatywny wpływ albuminy na adhezję komórek (J. Mater. Chem., 2007, 17, 4079–4087; Acta Biomaterialia 26 (2015) 72–81). Ponadto modyfikacje silanami zmieniają zarówno zwilżalność próbek jak i ich ładunek i energię powierzchniową. Grupy aminowe i karboksylowe zwiększają adhezję komórek w największym stopniu, a grupy hydroksylowe mają najmniejszy wpływ. Dlaczego więc nie wyznaczono energii powierzchniowej, skoro dokonano pomiarów kąta zwilżania oraz nie zbadano adsorpcji białek do opracowanych powierzchni.

- 10) Na adhezję komórek ma wpływ nie tylko zwilżalność i adsorpcja białek, ale również nanotopografia powierzchni, która bezpośrednio wpływa na konformację zaadsorbowanych białek (Bacakova et al.; Biotechnology Advances 29 (2011) 739–767). W dyskusji brakuje omówienia wpływu topografii/chropowatości powierzchni badanych próbek. Intersujące byłoby także badania wpływu modyfikacji powierzchni na różnicowanie komórek (aktywność fosfatazy alkaicznej (ALP) czy mineralizacja macierzy), zwłaszcza w przypadku komórek SaOs2, które mają bardziej dojrzały fenotyp i wysoką aktywność ALP.

Mimo tych nielicznych uwag do pracy, wysoko oceniam opiniowaną rozprawę doktorską. Posiada wiele aspektów poznawczych i stanowi oryginalny wkład Doktorantki w rozwój chemicznych metod modyfikacji i funkcjonalizacji powierzchni tytanowych. Stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim jest opracowanie metod modyfikacji nanoporowatych warstw anodowego tlenku tytanu (IV) dla zastosowań medycznych, które poprawiają bioaktywność, biointerakcję z komórkami oraz pozwalają w pewnym zakresie sterować dostarczaniem leków.

4. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższą opinię, uważam, że rozprawa mgr Anny Pawlik zatytułowana: “ **Modyfikowane nanoporowate warstwy anodowego tlenku tytanu (IV) – charakterystyka i zastosowanie biomedyczne**”, spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki”.

Wniosuję więc do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony.

Ponadto, biorąc pod uwagę obszerny zakres zrealizowanych badań, ich wysoki poziom naukowy i duże znaczenie dla rozwoju dyscypliny, jak również wyróżniającą aktywność naukową mgr Anny Pawlik (liczne publikacje naukowe, w tym 3 ściśle związane z pracą i wystąpienia konferencyjne), które moim zdaniem znacznie przekraczają zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim, wniosuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy.

Wojciech Świążkowski

