

Gdańsk, dnia 28.05. 2016 r.

dr hab. inż. Marek Szkodo, prof. nadzw. PG.

Katedra Inżynierii Materiałowej i Spajania

Wydział Mechaniczny

Politechnika Gdańska

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Mileny Suprenak-Marczewskiej

„Bioaktywne powłoki chitozanowe na implantach tytanowych”

pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Zielińskiego, prof. zw. w PG,
wykonanej w Katedrze Inżynierii Materiałowej i Spajania na Wydziale Mechanicznym
Politechniki Gdańskiej.

Wstęp

Dane literaturowe wskazują, że zapotrzebowanie na nowe materiały w dziedzinie medycyny obecnie znacznie wykracza poza tradycyjny obszar stosowania implantów i obejmuje wszystkie grupy materiałów inżynierskich. W grupie materiałów biomedycznych, znajdują się zarówno metale i ich stopy, ceramiki i szkła a także polimery, zarówno sztuczne jak i naturalne. Wśród tych ostatnich coraz większym zainteresowaniem cieszy się chitozan – polimer otrzymywany z chityny stanowiącej budulec wielu krabów i skorupiaków. Jego zaletami są bardzo dobra biogodność i właściwości bakteriobójcze oraz stosunkowo niski koszt wytwarzania. Z tych powodów chitozan coraz częściej jest proponowany jako składnik bioaktywnych powłok lub biokompozytów. Zatem temat pracy doktorskiej Pani mgr inż. Mileny Suprenak-Marczewskiej wpisuje się dobrze w główny nurt badań nad zastosowaniem chitozanu w aspekcie jego zastosowań na implanty. Autorka rozprawy jest przekonana, że chitozan może znaleźć zastosowanie jako zamiennik kalogenu w procesie sterowanej regeneracji kości, ale także jako zamiennik powłoki hydroksyapatytowej na implantach wytwarzanych na stopach tytanu. Aby tak się stało niezbędna jest jednak wiedza o właściwościach chitozanu. Trafnie określono w pracy, że właściwości te zależą od wielu czynników między innymi od rodzaju skorupaka, z którego go pozyskano oraz od sposobu jego otrzymania, to jest od stopnia deacetylacji.



Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska liczy 95 stron. Na początku rozprawy zamieszczono spis symboli i skrótów, po których znajduje się wstęp. Rozprawa zawiera w swojej początkowej części omówienie obecnego stanu wiedzy dotyczącego chitozanu, tytanu i jego stopów oraz czynników wpływających na właściwości biomateriałów. Ta część rozprawy doktorskiej związana jest z jej tematem i liczy 31 stron. Zdecydowana większość informacji zamieszczona w tej części dysertacji to informacje przepisane z książek a nie krytyczna analiza literatury dotycząca tematu rozprawy. Brak jest opisu dotychczasowych wyników badań uzyskanych w tym temacie przez innych autorów ich porównania i na tej podstawie wyciągnięcia wniosków i sformułowania tezy pracy. W dalszej części rozprawy zamieszczony jest rozdział „Teza, cel i zakres pracy”, w którym Autorka zamieszcza dwa cele pracy – naukowy i użytkowy. Celem naukowym rozprawy było określenie zależności między stopniem deacetylacji chitozanu oraz biogodnością i aktywnością biologiczną implantu z naniesioną powłoką chitozanu. Celem użytkowym było zaś opracowanie technologii pokrywania powierzchni metalu powłoką chitozanową o odpowiednich właściwościach. W rozdziale tym postawiono tezę: **„Modyfikacja warstwy wierzchniej tytanu poprzez naniesienie powłok chitozanowych o odpowiednim stopniu deacetylacji powoduje zwiększenie biogodności oraz aktywności biologicznej implantu tytanowego”**. Tezę pracy uważam za poprawną pod względem naukowym i jasno sformułowaną. Uważam jednak, że w tezie powinno znaleźć się także to, że nie tylko stopień deacetylacji ale również pochodzenie chitozanu mają wpływ na jego właściwości bowiem w dalszej części rozprawy właśnie te dwie zmienne są analizowane. Program badań i zastosowane metody badań są całkowicie adekwatne do postawionych zadań. W drugiej części rozprawy Autorka opisuje wyniki badań powłok chitozanowych o dwóch różnych stopniach deacetylacji DD87 i DD94 oraz dwóch powłok chitozanowych o tym samym stopniu deacetylacji DD87 ale pochodzących z różnych źródeł to jest z pancerzy krewetek i pancerzy krabów. Badania bioaktywności powłok chitozanowych obejmowały hodowlę komórek kościotwórczych oraz testy proliferacji komórek kościotwórczych i były wykonane na powłokach chitozanowych wykonanych na podłożu tytanowym. Również badania nanotribologiczne chitozanu wykonano na powłokach osadzonych na podłożu tytanowym. W dysertacji zawarto również opis przygotowania tytanowego podłoża poprzez jego utlenianie gazowe oraz badanie morfologii utlenionej warstwy. Natomiast analiza topografii powierzchni a także badania

zwilżalności zostały wykonane na cienkich „plasterkach” samego chitozanu. Podsumowanie wyników badań zawiera rozdział zatytułowany „Dyskusja”, w którym przedstawiono analizę możliwości wytwarzania powłok chitozanowych na tytanowym podłożu oraz ocena wpływu stopnia deacetylacji chitozanu oraz jego pochodzenia na jego właściwości biologiczne. Taka analiza, nadaje tematowi rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Mileny Suprenak-Marczewskiej walor aktualności szczególnie dzięki uwzględnieniu w ocenie właściwości chitozanu jego pochodzenia oraz jego stopnia deacetylacji. Rozprawa podsumowana jest ośmioma wnioskami i kończy się spisem literatury, spisem rysunków i tabel oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Autorka powołuje się na 100 pozycji literaturowych. Doktorantka cytuje cztery prace, których jest autorem bądź współautorem w tym jedną pracę dotyczącą tematu rozprawy. Spośród 100 pozycji literaturowych 21 to artykuły i książki nie starsze niż pięć lat. Zdecydowana większość pozycji literaturowych to pozycje anglojęzyczne.

Uwagi krytyczne

Do krytycznych uwag merytorycznych zaliczam:

- Brak jasnej informacji na temat stopnia deacetylacji chitozanu użytego do badań. W rozdziale „Teza, cel i zakres pracy” na stronie 41 podano, że obiektem badań były powłoki chitozanowe o stopniu deacetylacji DD86, DD86 Sigma i DD94 naniesione na podłoże tytanowe. Potwierdzono to we wniosku nr 5 na stronie 81. Z kolei na stronie 43, 48, 50 i dalszych Autorka podaje, że stopień deacetylacji powłok wynosił DD87 i DD94. Poza tym raz w pracy podaje stopień deacetylacji DD87 czy DD94 a raz DD87% i DD94%. Dodatkowo brak jest w pracy jasnej informacji, które badania wykonano na powłokach chitozanowych naniesionych na tytanowe podłoże, a które na samym chitozanie bez żadnego podłoża.
- Brak jest w pracy informacji o grubości chitozynowych powłok osadzonych na tytanie oraz grubości samego chitozanu.
- Brak informacji o chropowatości powierzchni tytanu, na którą nanoszono powłoki chitozanowe.
- Na stronie 43 podano, że jako podłoże dla powłok chitozanowych użyty został tytan o czystości 99,4%. Na tej samej stronie zamieszczono tabelę 6, w której podano skład chemiczny użytego do badań tytanu, z której wynika, że czystość tytanu wynosiła 99,305%, więc jaka była czystość tytanu?

- W rozdziale 6.6 na stronie 47 podano informacje o sposobie wykonywania powłok chitozanowych na tytanowym podłożu. Z opisu wynika, że chitozan był osadzany na tytanowych blaszkach poprzez trzykrotne ich zanurzenie w odpowiednio przygotowanym roztworze. Podano informację, że odstęp pomiędzy poszczególnymi zanurzeniami wynosił 5 min ale nie podano ile wynosił czas zanurzenia.
- Na rysunku 13 na stronie 42 przedstawiony został schemat wykonywanych badań. Na schemacie tym brak jest informacji o badaniach nanotribologicznych. Brak jest również powiązania pomiędzy poszczególnymi badaniami, z których można by wyciągnąć wnioski.
- Na stronie 50 podano informacje o badaniach powłok chitozanowych na nanotribometrze. Autorka informuje, że badania polegały na cyklicznym nacisku powierzchni próbki ceramiczną kulką o średnicy 2 mm przy parametrach: promień 1,5 mm, zakres ruchu 90°, częstotliwość 1 Hz, liczba cykli 60 na min, obciążenie 100 mN. Czy można powiedzieć, że to były badania nanotribologiczne jeżeli kulka miała średnicę 2 mm. Co to znaczy, że promień wynosił 1,5 mm. Co to znaczy, że badania polegały na cyklicznym nacisku a jednocześnie podaje się zakres ruchu 90°. Co to znaczy, że częstotliwość wynosiła 1 Hz a liczba cykli była 60 na min?
- W tabelach 7, 8 i 9 podano parametry topograficzne powłok chitozanowych Ra, Rq i Rp. Nigdzie w pracy nie jest wyjaśnione co oznacza parametr Rq.
- Na stronie 57 podano, że wartość kąta zwilżania wzrasta ze stopniem deacetylacji. Czy na podstawie tylko dwóch różnych stopni deacetylacji można stwierdzić jaki będzie trend zmiany kąta zwilżania wraz ze zmianą stopnia deacetylacji. Dodatkowo na rysunku 21 na stronie 58 zamieszczono informację, że kąty zwilżania dla powłok DD87 sigma i DD87 różnią się o około 4° a więc przy tym samym stopniu deacetylacji są różne.
- Na stronie 58 podano, że struktura warstwy tlenkowej na tytanie jest jednorodna i bez nieciągłości. Jednocześnie na rysunku 23 na stronie 59 pokazano topografię powierzchni warstwy tlenkowej, na której widać nieciągłość powierzchni.
- Na stronie 60 podano, że po 72 h hodowli komórki zajmowały ok 80% powierzchni jednak nie podano jaką metodą zostało to zbadane.
- Na stronie 62 podano, że określano szybkość proliferacji komórek na powierzchni chitozanowej powłoki i jako wynik podano, że po 7 dniach osteoblasty zajmowały około 80% powierzchni. Trudno stwierdzić, że to były badania szybkości proliferacji.
- Na stronie 65 podano informację, że po wybarwieniu chitozanu czerwienią alizarynową stwierdzono brak chitozanowej powłoki na tytanowej płytce w miejscu umieszczenia na

niej kleszczy. Czy z tego wynika, że płytki tytanowe tylko na chwilę zanurzano w roztworze i nawet na chwilę nie uwalniano z kleszczy.

- Rysunki 35-37 są błędnie opisane. Nie wiadomo czy na osi rzędnych przedstawiono siłę tarcia czy siłę nacisku kulki normalną do badanej powierzchni. Skala tej siły jest błędnie przedstawiona tj na skali powtarzają się te same wartości. Na innej skali na osi rzędnych przedstawiono głębokość zagłębienia kulki o średnicy 2 mm przy czym głębokość ta wynosiła setne części nm czy to jest możliwe? Z kolei na trzeciej osi rzędnych przedstawiającą zmianę współczynnika tarcia zamieszczono skalę od -0,9 do +0,6. Czy wobec tego ten współczynnik może przyjmować wartości ujemne. Dodatkowo na osiach odciętych pokazano dwie skale, z których na jednej są same zera. Przedstawionych na tych rysunkach wyników nie ma z czym porównać. Autorka powinna wykonać takie same badania dla utlenionych warstw tytanu i uzyskane wyniki porównać z wynikami uzyskanymi dla warstw chitozanowych.
- Na stronie 71 w rozdziale „Dyskusja” Autorka pisze „Wykonane badania wykazały, że zastosowana technologia pozwala na wytworzenie powłok chitozanowych o strukturze, topografii i właściwościach, które dają pozytywną odpowiedź komórkową w warunkach *in vitro*”. Z zamieszczonych wcześniej wyników badań na rys 31 wynika, że odpowiedź komórkowa jest najlepsza dla utlenionego tytanu, a więc powłoki chitozanowe pogorszyły tę właściwość powierzchni.
- W tym samym rozdziale na stronach 71 i 72 Autorka pisze „Właściwości biologiczne uzyskanych powłok zostały wykazane poprzez prawidłową adherencję ... komórek do podłoża” Jednak takich badań autorka nie wykonywała.
- W tym samym rozdziale Autorka pisze, że przeprowadzone badania wykazały hydrofobowy charakter powłok ale nie wyjaśnia od jakiego kąta zwilżania można uznać hydrofobowość. Dodatkowo brak jest wyników kąta zwilżania dla utlenionego tytanu.
- W tym samym rozdziale Autorka pisze, że powłoka chitozanowa posiadała wystarczającą przyczepność do podłoża bez względu na stopień deacetylacji. Nie wiadomą skąd takie stwierdzenie się wzięło ponieważ takich badań w pracy nie przedstawiono.
- Na stronie 72 Autorka pisze, że stosowała w swoich badaniach „silnie wypolerowaną powierzchnię (ostatni papier ścierny 2400)”. Czy po szlifowaniu można otrzymać wypolerowaną powierzchnię?
- Na stronie 75 Autorka pisze „Wszystkie membrany wykazały umiarkowaną hydrofilność”. Czy umiarkowana hydrofilność to jest to samo co umiarkowana hydrofobowość?

- Na stronie 81 we wniosku nr 1 Autorka pisze, że badania pozwoliły na wykazanie istotnej roli pochodzenia chitozanu w kształtowaniu jego masy cząsteczkowej i budowy przestrzennej a przecież takich badań nie było w dysertacji.
- Na stronie 81 we wniosku nr 2 Autorka pisze, że membrany chitozanowe wykazują w warunkach in vitro istotną bioaktywność wystarczającą do stosowania ich w medycynie ale nie podaje żadnego wskaźnika tej bioaktywności.
- Na tej samej 81 stronie we wniosku nr 6 napisano, że membrany chitozanowe są dobrze przyczepne do podłoża, dość odporne mechanicznie, o wysokiej bioaktywności i nadają się zwłaszcza na implanty stomatologiczne, jednak w pracy nie zamieszczono wyników badania przyczepności powłok i odporności mechanicznej a bioaktywność tych warstw była mniejsza niż utlenionych warstw tytanu. Nie wiadomo również skąd wniosek o przydatności akurat na implanty stomatologiczne.

Pod względem edytorskim praca jest wykonana dobrze, napisana jest prostym i jasnym językiem. Jednak i w tym obszarze Autorka nie ustrzegła się wielu błędów. Najważniejsze z nich to:

- na stronie 9 napisano, że właściwości chityny mają wpływ na chemiczną czystość a jest dokładnie odwrotnie,
- razi różne formatowanie tabel zamieszczonych w pracy,
- w tabeli 2 na stronie 19 podano, że wytrzymałość na rozciąganie tytanu wynosi 241 GPa,
- w tabeli 3 brak jest nawiasu kwadratowego przy jednostkach wydłużenia, w tabeli 4 brak takich nawiasów dla jednostek R_m , $R_{0,2}$ i R_z a w tabeli 10 brak nawiasu dla stopni,
- na stronie 33 napisano „Takie właściwości posiada martenzyt w stalach kobaltu” powinno być w stopach kobaltu,
- na stronie 39 napisano „warstwa jonów o ruchomych o ładunku różnoimmiennym”,
- na stronie 40 napisano „ilości i rodzaju syntezowanych białek” powinno być liczbie i rodzaju białek,
- niektóre podpisy pod rysunkami albo nad tabelami znajdują się w dużej odległości od rysunków lub tabel,
- czy naprawdę konieczny jest rysunek 16 i 17 przedstawiający pojemnik, do którego rozlewano roztwór chitozanu i butelkę do hodowli komórek,
- na rysunkach 18-20 przedstawiono więcej niż jeden obraz i brak jest do nich odnośników a), b) itd. a także brak opisu tych obrazów pod rysunkiem,

- na rysunkach 18-20 zbędne są obrazy a) i b) a wszystkie linie pomiarowe można zaznaczyć na rysunku c),
- na rysunku 24 na stronie 60 jest nieczytelna skala na osi odciętych i brak skali na osi rzędnych,
- na stronie 62 napisano ilość osteoblastów a powinna być liczba osteoblastów,
- zły styl zdania „Przyczyną jest umieszczenie kleszczy w tym miejscu próbki podczas zanurzania próbki w roztworze chitozanu w miejscu umieszczenia kleszczy”,
- nieprawidłowe podpisy pod rysunkami 32-34 „powierzchnia pokryta powłoką DD87” powinno być „powierzchnia pokryta chitozanem o stopniu deacetylacji 87”
- nieprawidłowy styl zdania na stronie 67 „Charakterystyki badania odporności na zacieranie”
- nieprawidłowy styl zdania na stronie 67 „Powłoka DD94 ukazała charakterystykę w formie stałym poziomie siły tarcia”,
- nieprawidłowe podpisy pod rysunkami 35, 36 i 37 jest „Charakterystyka badania odporności na zacieranie” a powinno być „Wyniki badań tribologicznych”,
- na stronie 74 jest „ilość komórek” a powinno być „liczba komórek”,
- nagminne zostawianie w tekście pustych miejsc,

Inne zauważone drobne nieścisłości stylistyczne nie były warte umieszczenia w recenzji, pozwoliłem sobie zwrócić na nie uwagę bezpośrednio Autorce.

W ogólnej ocenie stwierdzam, że Pani mgr inż. Milena Suprenak-Marczewska w pełni zrealizowała zadanie badawcze będące przedmiotem rozprawy. Biorąc pod uwagę aktualność tematyki pracy w świetle prowadzonych na świecie badań, potrzeby praktycznych rozwiązań inżynierskich, klarowne sformułowanie tezy i celu pracy oraz ich osiągnięcie na drodze dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych badań, a w końcu dyskusji otrzymanych wyników, oceniam przedstawioną rozprawę doktorską pozytywnie i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr inż. Mileny Suprenak-Marczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Na podstawie przedstawionej opinii stwierdzam, że praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, przewidziane odpowiednimi ustawami.

Gdańsk, 28 maj 2016 r.

