Kraków 12.12.2023

Dr hab. inż. Roman Major prof. PAN

Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN

Ul. Reymonta 25, 30-059 Kraków

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Leśniak Ziółkowskiej pt. „Nowa generacja powierzchni bakteriostatycznych/ antybakteryjnych otrzymanych metodą PEO w zawiesinach związków srebra, miedzi i cynku na implantach dedykowanych tkance twardej"

Rozprawa pani mgr inż. Katarzyny Leśniak Ziółkowskiej dotyczy rozwoju materiałów dedykowanych do rekonstrukcji tkanki kostnej. Ogólnie na wstępie można stwierdzić, że jest to bardzo wartościowe dzieło naukowe, które mogłoby stanowić wartościowe źródło wiedzy dla kolejnych pokoleń naukowców zajmujących się podobną tematyką. Praca ma charakter podstawowy z zaznaczonym kierunkiem jej aplikacji. Pani mgr Leśniak Ziółkowska opracowała technikę wykorzystania nierozpuszczalnych związków cynku, miedzi oraz srebra w procesie plazmowego utleniania elektrochemicznego w celu wytworzenia porowatych warstw tlenkowych na powierzchni stopów tytanu o właściwościach antybakteryjnych.

Praca zawiera 135 stron, 6 tabel, 38 rysunków. Część teoretyczną oraz aktualny stan wiedzy z zakresu pracy oparto na 171 pozycjach literaturowych. Przegląd literaturowy oparto na najnowszych doniesieniach literaturowych, ale również z uwzględnieniem pozycji starych, kluczowych miedzy innymi opracowania prof. Jana Marciniaka. Mam jedynie taką uwagę, że należało również sięgnąć do pozycji pt. „Biomateriały" tego autora.

Ocena części teoretycznej:

Praca ma typowy charakter prac doktorskich, składa się ze Wstępu oraz kolejno rozdziałów, wprowadzających bardzo jasno czytelnika w tematykę pracy, takich jak ogólny opis biomateriałów, opis biomateriałów tytanowych, opis czynników wpływających na bioaktywność, plazmowe utlenianie elektrochemiczne, opis możliwych zakażeń septycznych,

stosowane aktualne metody leczenia oraz kończąc na opisie związków bakteriostatycznych i antybakteryjnych. Obecnie inżynieria materiałów bardzo mocno wkracza w świat medycyny i biologii, co można zauważyć też na przykładzie tej pracy. Autorka wychodzi naprzeciw obecnym potrzebom klinicznym oferując niefarmakologiczne rozwiązania techniczne, które z powodzeniem mogłyby znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej. Stosowanie jakichkolwiek terapii farmakologicznych, jest dodatkowym obciążeniem dla pacjenta co również przekłada się na zwiększenie ryzyka powstania komplikacji okołooperacyjnych. Stworzenie nowych technik alternatywnych zmniejsza to ryzyko. Oczywiście należy sobie zdawać sprawę z faktu, że postęp w inżynierii biomateriałów jest bardzo wolny i wymaga pokonania bardzo żmudnej drogi certyfikacji. W tej dziedzinie można mówić o ewolucji rozwoju technologicznego. Po przeczytaniu rozprawy doktorskiej nie mam obaw, że mgr inż. Katarzyna Leśniak Ziółkowska, nie zdaje sobie z tego sprawy. Z drobnych uwag w tej części chciałbym podkreślić:

- brak wprowadzonej oficjalnej definicji stworzonej przez Europejskie Towarzystwo Biomateriałów. Na początku rozdziału 1.1 jest jedynie opisowe przedstawienie tej definicji.
- w rozdziale 1.1 autorka opisuje, że aktualne badania mające na celu wytworzenie materiału odpowiednio wpływającego na różnicowanie komórek mezenchymalnych, co oczywiście jest prawdą, ale brak informacji o komórkach indukowanych, za co przyznano w 2012 roku nagrodę Nobla.
- w charakterystyce biomateriałów tytanowych, rozdział 1.2 przedstawiono brak negatywnego odziaływania tytanu na organizm. Jednak istnieją artykuły w pismach naukowych, które wykazują, że ta opinia może być błędna. Część badaczy, którzy są zatrudnieni w Zakładzie Alergologii Klinicznej i Środowiskowej Collegium Medicum UJ, głosi, że „alergia na implant tytanowy w świetle danych klinicznych wydaje się być narastającym, choć na razie rzadkim problemem". Dowodzą w ten sposób, że tytanowe implanty mogą przyczyniać się do wystąpienia reakcji alergicznej. Dzieje się ponoć dlatego, że tytan wchodzi w uboczną reakcję za sprawą domieszek, które zostały użyte do produkcji metali.
- Pani Mgr zwraca uwagę na ważne zjawisko bioaktywności i osteoindukcji i twierdzi, że to zależy od związków wapnia i fosforu. Uważam, że nie do końca tak jest, myślę, że to zależy również od procesów naturalnych przebudowy

kości. Proces ten aktywowany jest nie tylko podczas ubytku. Materiały konstruowane do rekonstrukcji tkanki kostnej mogą też wpływać na proces przebudowy tkanki. W naturalnych warunkach, tego typu proces, zachodzi ciągle. Tkanka kostna, począwszy od okresu neonatalnego aż po późną starość jest aktywna metabolicznie i podlega procesowi ciągłej przebudowy. Proces ten nazywa się remodelowaniem kostnym i dotyczy zarówno wielkości oraz kształtu kości, jak i wewnętrznego przestrzennego ułożenia beleczek kostnych, co ostatecznie wpływa na ich wytrzymałość mechaniczną. Fizjologicznie w tkance kostnej dochodzi do nieustannych zmian, na które składają się procesy kościotwórcze i kościogubne. Za zrównoważenie tych dwóch procesów odpowiedzialne są swoiste komórki tkanki kostnej zwane osteoblastami, które odpowiadają za procesy syntezy oraz osteoklasty, które wpływają na resorpcję kości. W rozwijającym się młodym organizmie dominują procesy kościotworzenia nad procesami resorpcji. U osobników z w pełni dojrzałym układem szkieletowym procesy te równoważą się, zaś w okresie starzenia się organizmu dochodzi do znacznego zmniejszenia masy kostnej, będącego wynikiem wzmożonej aktywności osteoklastów. Dodatkowo proces remodelingu wywoływany jest poprzez czynnik chemiczny lub fizyczny. Można stwierdzić, że takim silnym czynnikiem zewnętrznym z grupy czynników mechanicznych jest rekonstrukcja i wprowadzenia sztucznego materiału do środowiska tkankowego.

- Stwierdzono, że odpowiedź komórkowa jest uzależniona od chropowatości powierzchni. Tu mam uwagę uzupełniającą, że sztywność i porowatość mają bardzo duże znaczenie. Doktorantka pisze w kolejnym rozdziale 1.4 o strukturach porowatych bez wcześniejszego uprzedzenia w poprzednim rozdziale, że jest to parametr konieczny.

Na pochwałę zasługuje bardzo dokładny opis metodyki i etapów tworzenia materiałów. Bardzo szczegółowo opisano proces plazmowego utleniania elektrochemicznego. Pracę podzielono na etapy co spowodowało, że eksperyment stał się czytelny zarówno dla wykonującego, jak i przede wszystkim dla czytelnika.

Opracowywane materiały mają wyeliminować ryzyko zakażeń szpitalnych. Jest to problem na tyle poważny, że wokół tego powstało wiele przepisów prawnych między innymi takich jak:1. Rozdział 3 i Rozdział 5 Ustawy z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (Dz.U. z 2022 r, poz. 1657 ze zm.) 2.

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 grudnia 2011 r. w sprawie listy czynników alarmowych, rejestrów zakażeń szpitalnych i czynników alarmowych oraz raportów o bieżącej sytuacji epidemiologicznej szpitala (Dz. U. z 2021r. poz. 240) 3. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 6 czerwca 2013 r. w sprawie bezpieczeństwa i higieny pracy przy wykonywaniu prac związanych z narażeniem na zranienia ostrymi narzędziami używanymi przy udzielaniu świadczeń zdrowotnych (Dz.U. z 2013 r. poz. 696) 4. Ustawa z dnia 14 grudnia 2012 roku o odpadach (Dz. U. z 2022 r. poz. 699 ze zm.) 5. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 27 maja 2010 r. w sprawie kwalifikacji członków zespołu kontroli zakażeń szpitalnych (Dz. U. z 2014 r. poz. 746) 6. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 27 maja 2010 r. w sprawie zakresu, sposobu i częstotliwości prowadzenia kontroli wewnętrznej w obszarze realizacji działań zapobiegających szerzeniu się zakażeń i chorób zakaźnych (Dz.U. z 2010 r. poz. 646) 7. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 27 maja 2010 r. w sprawie sposobu dokumentowania realizacji działań zapobiegających szerzeniu się zakażeń i chorób zakaźnych oraz warunków i okresu przechowywania tej dokumentacji (Dz.U. z 2010 r. poz. 645) 8. Ustawa z dnia 7 kwietnia 2022 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. z 2022 r. poz. 974). Zaproponowane materiały wpisują się jak najbardziej w zakres tematyki konieczności obniżenia ryzyka występowania tego typu problemów. Żywotność bakterii na różnych powierzchniach powinna być ewentualnie uzupełniona o ocenę za pomocą metody określającej aktywność antybakteryjną biomateriałów zgodnie z normą ISO 22196 (JIS Z 2801 Test for Antimicrobial Activity of Plastics). Do badania powinny być zastosowane szczepy Staphylococcus aureus i Escherichia coli. Próbki każdej powierzchni powinny być w tym teście porównywane z pustymi powierzchniami kontrolnymi przeciwko klinicznemu izolatowi MRSA.

Ocena części dotyczącej celu i hipotez badawczych:

Kolejna polemika dotyczy sformułowania celu. Cel, wg wytycznych [DIN 69905] jest to weryfikowalny efekt i/lub żądanie zrealizowania całego zakresu zadań w projekcie. Aby umożliwić dokonanie skutecznej weryfikacji powodzenia pracy lub projektu, musi on być kwantyfikowalny, tj. mierzalny, ponieważ cele są pomocne jedynie wtedy, gdy można je przekształcić w zdefiniowane cele ilościowe. Oczywistym jest, że poprawnie zdefiniowane muszą one być także osiągalne. Na podstawie tej definicji wg Stowarzyszenia Project Management Polska, uważam, że zaproponowane cele powinny być sklasyfikowane wg następującej nomenklatury: wyznaczenie celu głównego, czyli tego, który stanowi całość pojedynczych celów związanych z efektem projektu i przebiegiem zadań, definiowanych jako

produktowe. Zgodnie z wytycznymi IPMA Polska mamy do czynienia z jednym celem głównym, który jest osiągalny poprzez osiągnięcie celów produktowych.

Ocena części doświadczalnej:

Część doświadczalna pracy została przedstawiona czytelnie i bardzo obszernie. W metodyce badawczej opisano bardzo dokładnie etapy wykonywania i badania materiałów. To co jest w pracy naukowej najważniejsze to możliwość przekazanie praktycznej wiedzy osobie, która chciałaby się wróżyć w dana tematykę. W ocenianej pracy to jak najbardziej jest widoczne. Doktorantka podjęła wszelkie starania, aby to co się nauczyła mogło też posłużyć innym. W ramach metodyki opisano syntezę związków cynku, miedzi i srebra, przygotowanie powierzchni stopów, proces plazmowego utleniania elektrochemicznego, charakterystykę właściwości itd. Pytanie mam do rozdziałów:

- 3.5- dlaczego nie uwzględniono techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej?
- 3.7- co było kryterium ustalenia długości badania w roztworze Ringera?
- 3.8- czy badania cytotoksyczności wykonano zgodnie z normą 10993? Czy wykonano badania pośrednie i bezpośrednie? Czy stosowano sondy molekularne do badania stopnia żywotności komórek?
- 3.9- co było kryterium doboru techniki sterylizacji? Czy w wyniku sterylizacji cyklicznej zmieniały się właściwości jakiekolwiek badanych materiałów?

Nie mam większych uwag do zaprezentowanych wyników badań, jedynie kwestie polemiczne:

- Brakuje przedstawienia napięcia przyspieszającego w badaniach SEM.
- Kolejne uwaga dotyczy wyników AFM, czy wspomniane obrazy to są obrazy pełne 3D, czy 2.5D?
- W rozdziale 4.3 przedstawiono przekroje poprzeczne warstw tlenkowych. Czy na podstawie tych wyników można mówić o dyfuzji?
- Rozdział 4.5- uważam za przedwczesne określenie przydatności biologicznej jedynie umieszczając materiał w roztworze Ringera. Jaki parametr stosowano w celu odróżnienia właściwości antybakteryjnych od bakteriostatycznych? Która z tych właściwości wg Doktorantki jest oczekiwana i dlaczego? Jak dobrano czas inkubacji w roztworze Ringera? Jak można tłumaczyć duże wartości słupków błędu na rys. 29, 30?

- Rozdział 4.7- Doktorantka pisze, że badania prowadzono na komórkach osteoblastopodobnych. Czy nie jest to zbyt duże uproszczenie. Komórki nowotworowe inaczej się zachowują i niestety są bardziej odporne na czynniki otaczające. Sugerowałbym poszerzenie, jeżeli planowana byłaby kontynuacja tej tematyki, o komórki zdrowe/poprawne. Dodatkowo sugerowałbym, oczywiście nie w ramach tej pracy, aby przeprowadzić badania poziomu dehydrogenazy mleczanowej zarówno w badaniach pośrednich jak i bezpośrednich.

Ogólna ocena pracy:

Całość pracy podsumowuje rozdział „Podsumowanie", który tak naprawdę jest również przedstawiony w formie dyskusji i wniosków, co uważam jest bardzo cenne i dodatkowo świadczące o dojrzałości naukowej Doktorantki. Praca przedstawia ciekawe opracowanie naukowe dotyczące rozwoju dziedziny inżynierii biomateriałów. Badania dotyczą biomateriałów do zastosowań w ortopedii. Pomimo uwag, jedynie natury polemicznej, uważam, że praca jest przygotowana czytelnie i bardzo starannie. Wyniki badań są unikatowe i bardzo ciekawe. Imponujący jest wachlarz zastosowanych metod, które zrealizowano w taki sposób, że wyniki badań uzupełniają się i ogólnie stanowią spójną całość. Stwierdzam, że przedstawiona praca doktorska odpowiada w pełni warunkom określonych w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Leśniak Ziółkowskiej do obrony przed Radą Dyscypliny Inżynieria Chemiczna w dziedzinie nauk inżynieryjno- technicznych. Zważywszy na wysoki poziom pracy wnoszę równocześnie o jej wyróżnienie.

Podpisano odręcznie przez autora