

Łódź, dn. 29.03.2024 r.

Dr hab. inż. Dorota Bociąga, prof. uczelni  
Zakład Inżynierii Biomedycznej i Materiałów Funkcjonalnych  
Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Mechaniczny Politechniki Łódzkiej  
ul. Stefanowskiego 1/15, 90-537 Łódź, Polska

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr inż. Urszuli Szafaj**

pt. „Inżynieria nano-powłok hydroksyapatytowych nanoszonych metodą  
ultradźwiękową na implanty ortopedyczne”

Promotor: Prof. dr hab. Witold Łojkowski

Niniejsza recenzja została wykonana na podstawie pisma Rady Naukowej Dyscypliny  
Inżynieria Materiałowa na Politechnice Warszawskiej.

## 1. UWAGI OGÓLNE O TEMATYCE ROZPRAWY

---

### 1.1. Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Recenzowana rozprawa doktorska pt. „*Inżynieria nano-powłok hydroksyapatytowych nanoszonych metodą ultradźwiękową na implanty ortopedyczne*” dotyczy ważnej i wciąż bardzo aktualnej tematyki związanej z modyfikacją powierzchni wyrobów medycznych stosowanych w układzie kostnym w celu poprawy ich osteointegracji z tkanką kostną a dzięki temu dobrej stabilizacji w ciele pacjenta. O ile rozwój biomateriałów daje coraz to lepsze możliwości w zakresie wytwarzania implantów spełniających wymagania pod kątem właściwości mechanicznych, czy zdolności do degradacji, o tyle modyfikacje powierzchniowe (dające możliwość determinowania właściwej odpowiedzi na granicy materiał – otaczająca tkanka) w postaci nanoszenia powłok, w tym np. hydroksyapatytowych, mają wciąż istotne ograniczenia. Są nimi np. temperatura procesów, złożoność pokrywanej geometrii, czy też brak możliwości kontroli wielkości nakładanych nanocząstek i grubości powłoki.

W swojej pracy Doktorantka skupiła się na osadzaniu jednorodnych nano-powłok hydroksyapatytowych, weryfikacji ich wpływu na zastosowanie różnej wielkości nanocząstek na właściwości powłok oraz sprawdzeniu, czy metoda SonoNanoCoating (SNC) (będąca połączeniem ultradźwiękowego pokrywania oraz mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek) pozwala na osadzanie nano-powłok na różnego rodzaju powierzchniach, kształtach i strukturze implantów ortopedycznych.

Biorąc pod uwagę fakt, że opracowane przez Panią mgr inż. Urszulę Szałaj materiały i technologia niosą znaczącą wartość aplikacyjną, temat niniejszej rozprawy jest tym bardziej aktualny i istotny. Dodatkowo, na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka podjęła się prac związanych nie tylko z technologią nanoszenia powłok, ale również wytworzenia ich zasadniczej składowej w postaci nanocząstek hydroksyapatytu z pełną świadomością, w jak dużym stopniu rozmiar tych cząstek (w skali nano) determinuje właściwości materiałów. Ponadto, zaproponowaną technologię SNC Doktorantka zweryfikowała nie tylko na różnego rodzaju materiałach stosowanych w medycynie, ale również na próbkach o skomplikowanych kształtach, aby móc ocenić zdolność pokrycia złożonych geometrii, które bardzo chętnie wprowadzane są poprzez wytwarzanie przyrostowe w postaci np. druku 3D. W związku z powyższym, podjęte przez Doktorantkę badania uważam za wysoce uzasadnione, wpisujące się w obecne trendy naukowe związane z rozwojem biomateriałów i niosące realne korzyści w zastosowaniach medycznych.

### 1.2. Cel i teza rozprawy

W niniejszej rozprawie doktorskiej Doktorantka wskazuje, iż **konsolidacja dwóch metod** (ultradźwiękowego nanoszenia powłok oraz mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek) **umożliwia skuteczne osadzanie nano-powłok hydroksyapatytowych o zaprogramowanej wielkości nanocząstek oraz regulowanej grubości, równomiernie na**

**powierzchnie materiałów porowatych, włóknistych i wykonanych w technologii 3D, w ekologicznym procesie o niskiej temperaturze, bez stosowania toksycznych chemikaliów, co uznać należy za tezę pracy.**

Celem rozprawy doktorskiej mgr inż. Urszuli Szałaj było udowodnienie powyższej tezy poprzez wykonanie prac, które obejmowały zbudowanie stanowiska do ultradźwiękowego osadzania nano-powłok oraz optymalizacja tej metody stosując nanocząstki hydroksyapatytu o różnej wielkości (które Doktorantka również wytwarzała) i pokrywając próbki wykonane z różnych materiałów (metaliczne, polimerowe, kompozytowe). Doktorantka analizowała wpływ wielkości nanocząstek na właściwości powłok, w tym na ich biokompatybilność.

## **2. FORMALNA STRONA ROZPRAWY**

---

### **2.1. Struktura rozprawy i wykorzystana literatura**

Recenzowana rozprawa liczy 185 stron, jest napisana w języku polskim i podzielona na 7 głównych rozdziałów. Pracę rozpoczyna streszczenie w języku polskim oraz angielskim zakończone słowami kluczowymi. Ponadto praca zawiera wykaz skrótów, wykaz źródeł finansowania przedstawionych badań, spis literatury (na który składa się 289 pozycji), spis rysunków oraz tabel. Zdecydowana większość cytowanej literatury pochodzi z ostatniego dziesięciolecia i są to głównie publikacje ze znaczących czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym. Publikacje zostały trafnie dobrane i poprawnie przypisane względem omawianych zagadnień. Niestety Doktorantka nie uniknęła kilku uchybień w zakresie referencji. Przytoczenie kilku zasadniczych pozycji literatury (zamiast 14) na potwierdzenie biokompatybilności i przydatności nHAP w regeneracji tkanki kostnej byłoby w zupełności wystarczające. Brak w treści pracy odniesienia do pozycji nr 81, 95, 136, 178, 217, 253, 263, 265, 283, które występują w wykazie rozpoczynającym się na stronie 156. W niektórych miejscach w pracy występują również omyłki w zakresie cytowania, jak np. na str. 22, gdzie pozycja 98 występuje dwa razy po sobie a pozycja 99 nie występuje w ogóle, str. 28, gdzie poz. 144 jest wskazana dwa razy podobnie jak pozycja 260 na str. 65. W niektórych fragmentach zaburzona jest kolejność cytowania (np. str. 24, gdzie najpierw jest cytowana pozycja 115 a w dalszej treści Doktorantka po raz pierwszy cytuje pozycję 113 a poz. 114 dopiero na stronie 25 po wcześniejszym przytoczeniu pozycji numerowanych do 120).

Układ pracy jest przejrzysty a treści kolejnych rozdziałów i podrozdziałów są poprawnie rozdzielone. W rozdziale 1. zatytułowanym „*Wprowadzenie*” znalazły się informacje dotyczące tematyki inżynierii tkanki kostnej, projektowania materiałów wspierających odtwarzanie fizycznych struktur i/lub funkcji białkowych, mineralnych i komórkowych składników kości, potrzebie opracowywania materiałów do regeneracji dobieranych pod kątem specyficznej potrzeby pacjenta oraz metod doskonalenia biomateriałów poprzez modyfikowanie ich

powierzchni, w tym powłokami składającymi się z hydroksyapatytu, co stanowi wiodącą tematykę niniejszej rozprawy. Rozdział 2. pracy, zatytułowany „Przegląd literatury”, jest analizą aktualnego stanu wiedzy i dotyczy głównie trzech obszarów: omówienia problematyki ubytków kostnych i metod ich leczenia (2.1), stosowanych implantów ortopedycznych w rozdziale na materiały, z których są wykonywane: metaliczne (2.2.1), ceramiczne (2.2.2), polimerowe (2.2.3) oraz metod modyfikacji powierzchni implantów powłokami hydroksyapatytowymi (2.3). Rozdział przeglądu literatury kończy podsumowanie (2.4), w którym Doktorantka wskazuje na ograniczenia istniejących metod osadzania powłok hydroksyapatytowych, co stanowi jednocześnie uzasadnienie podjęcia prac przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Rozdział 3. stanowi opis tezy (3.1) i celu pracy (3.2). Rozdział 4. zatytułowany „Metody eksperymentalne” podzielony jest na trzy podrozdziały. Pierwsze dwa dotyczą materiałów, które były wykorzystywane i badane oraz metod, jakimi Doktorantka je uzyskała, mianowicie: 4.1. opisuje hydrotermalną syntezę mikrofalową nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed a 4.2. ultradźwiękowe osadzanie powłok nanocząstek hydroksyapatytu SonoNanoCoating (SNC). W podrozdziale 4.3. Doktorantka skupiła się na opisie metod, którymi charakteryzowała nanocząstki (4.3.1) oraz powłoki (4.3.2). Najobszerniejszą częścią pracy jest rozdział 5. zatytułowany „Część eksperymentalna”, który opisuje właściwości otrzymanych nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed (5.1), dobór podstawowych parametrów osadzania powłok hydroksyapatytowych metodą SonoNanoCoating (5.2), metodę ultradźwiękową – jako uniwersalną metodę modyfikacji powierzchni materiałów (5.3) oraz wpływ nano-powłok hydroksyapatytowych nakładanych metodą SonoNanoCoating na biologiczne właściwości materiałów (5.4). Dyskusja i podsumowanie wyników części eksperymentalnej zostały zamieszczone w rozdziale 6. Ostatni rozdział (7) stanowi pięć wniosków, którymi Doktorantka całościowo konkluduje syntezy i analizy przeprowadzone w pracy.

## **2.2. Język i formalna strona rozprawy**

Praca stosuje się do podstawowych zasad typografii. Zawiera 15 tabel oraz 90 rysunków. Niektóre podpisy rysunków powinny być bardziej rozwinięte, jak również wprowadzać objaśnienia oznaczeń – jak np. A, B, C, D na Rysunku 13. Rysunki 84 i 85 zawierają oznaczenia A, B, C, niestety nie zostały one wyjaśnione w podpisach rysunków (ani też w treści pracy) a jest jedynie odwołanie do publikacji [260]. Ta sama uwaga dotyczy Rys. 86 (w tym przypadku występuje oznaczenie A, B, C, E a D pominięto). Tabela 8 zawiera opisy, które w swym nazewnictwie mieszają język polski i zapożyczenia anglojęzyczne. Na stronie 31 przywołany jest Rysunek 1, który miałby przedstawiać homopolimery z rodziny PLA, jednak rysunku o takiej zawartości nie zamieszczono w pracy a przytoczony Rys. 1 przedstawia budowę kości w odniesieniu do struktury naturalnej gąbki morskiej. Dość zaskakujące jest również, że w pracy widnieje Rys. 5, który w treści nie został nigdzie przywołany. Na stronie 72 Doktorantka powołuje się na Rysunek 9, który nie dotyczy opisywanego zakresu w tej części

pracy, na str. 126 znajduje się informacja, że „więzadła modyfikowano powłokami składającymi się z nanocząstek hadroksyapatytu GoHAPmed o charakterystyce przedstawionej w Tabeli 5”, a tymczasem Tabela 5 opisuje próbki jako GoHAP. Niedosyt poznawczy budzi zdjęcie z SEM oznaczone na Rys. 74 jako E3, które miałyby pokazywać pojedyncze mikrometryczne ziarno HAP, ale zamiast jego wycentrowania, jest ono do połowy ucięte na wskazanym zdjęciu. Również obraz AFM zaprezentowany na Rys. 75 (poza zaznaczeniem strzałkami) nie wizualizuje dobrze powstałych rys. W opisach badań żywotności i proliferacji komórek hFOB 1.19 na str. 137 jest odwołanie do wyników obserwacji pod mikroskopem konfokalnym jako Rys. 89 oraz wyników testu WST-8 jako Rys. 88, podczas, gdy rysunek 89 przedstawia wyniki uwalniania białka a rysunek 88 różnice wynikające z zastosowania warstwy zarodkowej na włóknie rusztowania kostnego. Zestawienie wyników z Rys. 26 i Rys. 27 na jeden wspólny wykres ułatwiłoby ich porównanie.

Język pracy jest właściwy dla opracowań naukowych. Jak w każdym tego typu opracowaniu, również i w pracy przedstawionej przez mgr inż. Urszulę Szalaj można wskazać pewne usterki, jak chociażby pomyłki językowe, drobne uchybienia w zakresie interpunkcji czy powtórzenia, np.: str. 13: „...lub wiązki włókien lub wiązki włókien”, str. 22.: „wyższą początkową adsorpcję białka”, str. 23: „...zapalenie stawów, lub wymagające resekcji fragmentu kości ze względu na chorobę nowotworową mogą potrzebować operacji wymagających implantów...”, str. 27: „... łączą w sobie ma rozmiar ziarna poniżej...”, str. 27: „dentystycznych”, str. 29: „...a także sztucznych dysków międzykręgowych a także sztucznych w ścięgien czy więzadeł...”, str. 33: „...charakteryzować się biokompatybilnością, wysoką wytrzymałość mechaniczną, odpornością...”, str. 37: „Skutkiem gwałtownej implozji jest powstanie obszarów zwanymi ...”, str. 51: „W procesie nazwa ultradźwiękowego osadzania...”, str. 70: „Zależność tę uzasadniona dwoma czynnikami...”, str. 76: „...jednakże na powłoka w niektórych miejscach była cieńsza...”, str. 80: podpis na rysunku 24 „Temperatura porcesu”, str. 88: „...uzyskano powłoki, która charakteryzowały się...”, str. 92: podpis pod Rysunkiem 38 „Powłoki składające się z nanocząstek o różnej wielkości nanocząstek...”, str. 98: czy odniesienie do Tabeli 11 dotyczącej próbek tytanowych drukowanych 3D jest rzeczywiście celowe mając na uwadze, że opis dotyczy próbek w postaci blachy tytanu grade 2?, str. 98: podpis na rysunku 45 „TYATN GRADE 2”, podpis pod rysunkiem 45 wskazuje na wyniki kąta zwilżania podłoża tytanu grade 2 przed modyfikacją, jednak takich wyników nie zamieszczono na tym rysunku, str. 112 ostatni wiersz – odniesienie jest do Tabeli 7 a powinno być do Tabeli 10, str. 124: „... mający na celu potwierdzenia trwałości powłoki...”, str. 129: „...zestawiono w Tabelki 13.”, „... oraz wyższej powierzchni właściwej...”, str. 141: „Materiał w postaci rusztowań kompozytowy...”.

Zdarzają się w pracy pomyłki oraz skróty myślowe, których zapisy mogą powodować odwrotne do zamierzonego rozumienie przekazu lub trudność w interpretacji, co Doktorantka miała dokładnie na myśli, np.: (str. 23) „Główne cechy implantów ortopedycznych to dokładność wymiarowa, odpowiednie właściwości mechaniczne, stabilność chemiczna i toksyczność”, gdzie zapewne chodziło o brak toksyczności, (str. 25) „...zdolność do wiązania

się z sąsiednią kością”, gdzie zapewne chodziło o kość pozostającą w bezpośrednim kontakcie, (str. 28) „...ponieważ porowaty hydroksyapatyt umożliwia kontakt z kością” – aż chce się zapytać, czy nieporowaty hydroksyapatyt takiego kontaktu umożliwić nie jest w stanie? Str. 31: „PCL wykazuje dłuższy czas degradacji (2-3 lata) i jest rozkładany...” – dłuższy od czego zatem? Str. 32: „Kinetyka degradacji PLLA zależy od jego krystaliczności, odkształcenia i mikrostruktury, które następują po jego rozmieszczeniu [198].” – intrygującym pozostaje, o jakim rozmieszczeniu tutaj mowa? Str. 52: „...odległość amplitudy od podłoża (15 mm)...”, str. 59: „...która przeszła do roztworu wyniku rozpuszczenia powłoki.”, „... analizę obrazy przeprowadzano...”, str. 61: powołania na dwa podrozdziały (3.3.4 oraz 4.3.8), których w pracy nie ma, str. 77: „Pomiar jonów ... wykazał niewielką zmianę...jednakże różnice te były nieistotne statystycznie.”, str. 78: „Morfologia powłoki uzyskanej w 30°C była zbliżona w każdym miejscu badanej próbki.”, str. 99: „... wraz ze wzrostem nanocząstek grubość powłok malała.”, „Chropowatość powłok składające się z nanocząstek...”, str. 139 podpis do Rys. 84 i 85: „... przekroju kompozytowego rusztowania kostnego modyfikowanej powłoką...”, str. 142: „Na Rysunek 88 (C i D) przedstawiono wpływ...”, str. 144 podpis do Rys. 89: „...bez zastosowania modyfikacji powierzchni [285].”, str. 145: „... parametrem, jaki można relegować poprzez...”.

Przyznać muszę, że dużą trudność w czytaniu pracy, zaburzającą proces zapoznawania się z nią i wynikami, stanowi brak spójności stosowanego nazewnictwa. Np. w opisie wyników na stronie 76 amplituda drgań wyrażona jest w mikrometrach, podczas gdy obrazy SEM (Rys. 21, str. 77) ten sam parametr pokazują w %. Również sama nomenklatura dla podłoży używanych w badaniach nie jest jasno przedstawiona – w opisach 4.2.2.5.1 – 4.2.2.5.6 występują konkretne wskazania, co do rodzaju materiału, na którym prowadzono badania, ale znajdują się tam również wskazania na implanty kręgosłupowe, śruby mocujące, czy też implanty sztucznego więzadła krzyżowego bez sprecyzowania, z jakiego materiału zostały wykonane. Dopiero późniejsze rozdziały ujawniają tę informację. Czasami Doktorantka stosuje w pracy oznaczenie GoHAP a czasami GoHAPMed – tabela z zestawieniem przyjętych oznaczeń próbek i parametrów procesów ich wytwarzania mogłaby podnieść czytelność pracy i jednoznaczność stosowanych zapisów, podobnie jak jasne rozgraniczenie powołań wyników dla próbek GoHAP, co do których przywołanie wyników opiera się na wcześniej opublikowanych artykułach. Dla niektórych wyników prezentowanych w rozprawie wskazywane są odnośniki literaturowe, w których to pozycjach badania prowadzone były dla próbek GoHAP a nie dla GoHAPMed a pozycja 256, która jest raportem wewnętrznym IWC PAN nie jest niestety pozycją otwartego dostępu, co uniemożliwia jej przeanalizowanie w kontekście prezentowanych w pracy wyników.

Powyższe wskazania nie stanowią wprawdzie błędu merytorycznego, niemniej jednak utrudniają zapoznawanie się z pracą, która powinna stanowić spójną całość również pod względem nomenklatury i oznaczeń.

### 3. OCENA MERYTORYCZNA

---

**Część dotycząca przeglądu literatury** w recenzowanej rozprawie doktorskiej zawiera wszystkie istotne elementy, w tym opisy uzasadniające wybór tematyki pracy, z której wynika teza i cel rozprawy. Wprowadzenie alfabetycznego wykazu skrótów zapewnia przejrzystość terminologiczną. Doktorantka poprawnie wyselekcjonowała zakres przytoczonej literatury. Analiza aktualnego stanu wiedzy została dokonana z rozmysłem.

**Część eksperymentalna** niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi przeważający zakres pracy a składają się na nią 4 podrozdziały. Badania w nich opisywane stanowią kolejne etapy opracowywania powłok (o potencjale zastosowania na różnego rodzaju powierzchniach, kształtach i strukturze implantów ortopedycznych) począwszy od nanocząstek hydroksyapatytu, które następnie zostały wykorzystane w procesie wytwarzania powłok, po samą metodę SonoNanoCoating (SNC) będącą połączeniem ultradźwiękowego pokrywania oraz mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek. Zastosowane metody badawcze (XRD, AFM, SEM, analiza gęstości, powierzchni właściwej i całkowitej objętości porów, uwalnianie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{PO}_4^{3-}$ , pomiar kąta zwilżania, ocena żywotności i proliferacji osteoblastów hFOB 1.19) pozwoliły na kompleksową analizę nanocząstek oraz osadzanych z nich powłok.

Na uznanie i podkreślenie zasługuje fakt, że badania przeprowadzone przez mgr inż. Urszulę Szałaj stanowią opracowanie kompleksowe a zaproponowane technologie i powłoki mogą być wykorzystane do wytwarzania funkcjonalnych powłok na materiały do zastosowania w inżynierii tkanki kostnej. Jak sama Doktorantka wskazuje w części dotyczącej tezy pracy „technologia SNC stanie się standardem w zakresie nanoszenia powłok i warstw na implanty ortopedyczne w nadchodzących latach”.

Do tej części rozprawy mam pewne pytania i drobne uwagi natury merytorycznej i edycyjnej i będę wdzięczna za udzielenie wyjaśnienia co do nich.

- 1) W podrozdziale 4.2.2.4. wskazano, że procesy prowadzono w odstępach czasowych 1, 4, 6 i 8 minut, natomiast wyniki (Rozdział 5.2.4) podawane są dla 1,2,4,6 i 8 minut.
- 2) Rys. 59 brak wyników dla GoHAPmed Typ 4 po 9 minutach prowadzenia procesu ultradźwiękowego nanoszenia powłoki.
- 3) Doktorantka pisze (str. 23): „Szczególną uwagę należy zwrócić na biokompatybilność przez cały okres życia implantu, który może trwać kilka lat.” Czy znane są Doktorantce przypadki użytkowania implantu przez okres dłuższy – np. kilkanaście, kilkadziesiąt lat? Jak należałoby postępować z implantami o trwałości kilku lat przy ich wszczepianiu osobom kilku, kilkunastoletnim? Czy dla osób młodych inne są zalecenia co do materiałów stosowanych do wytwarzania implantów?

- 4) Sformułowanie (str. 22): „Lim i współautorzy wykazali, że nanopory o mniejszej gęstości (14 i 29 nm), indukowały znacznie większe rozprzestrzenianie się i przyleganie ludzkich płodowych komórek osteoblastycznych (hFOB) niż głębsze nanopory (45 nm) na powierzchni poli(kwasu L-mlekowego) [107].” Co oznacza „mniejsza gęstość” nanoporów i jej wyrażenie w nanometrach?
- 5) Pytanie dot. rozdziału 4.1. Doktorantka opisuje metodę eksperymentalną syntezy nanocząstek hydroksyapatytu, którą zastosowała w swojej pracy, wskazując, że synteza ta bazowała na wcześniej opublikowanym opracowaniu (wieloautorskim) a autorka rozprawy opracowała procedury syntezy zgodnie ze standardami normy ISO 13485. Uprzejmie proszę Doktorantkę o wskazanie, na czym dokładnie polegały prace związane z opracowaniem procedury a tym samym, jaki był wkład naukowy w samą syntezę. Sam zakup odczynników o czystości medycznej trudno nazwać wkładem naukowym a reaktor (jak pisze Doktorantka) został opracowany przez Laboratorium IWC PAN oraz ITEE (str. 43). Jak zastosowanie odczynników o czystości medycznej wpłynęło na uzyskane wyniki? W swojej pracy Doktorantka wskazuje ten dobór jako prace i osiągnięcie zrealizowane w ramach niniejszej rozprawy, jednak przytaczane wyniki uwalniania jonów  $Ca^{2+}$  odnoszą się do próbek GoHAP (publikacji nr 270) i występuje dla nich Typ2, który nie występuje w Tabeli 5 podającej wyniki dla GoHAPmed. Nie wiadomo zatem, jak skorelować wyniki ze względu na brak odniesienia co do oznaczeń próbek. Z opisów (choćby na stronie 73) wnioskować można, że jednak rozbieżności we właściwościach występują, ponieważ Doktorantka pisze, że „Istotną zmianę w pH zaobserwowano również w przypadku nanocząstek GoHAP Typ2 oraz GoHAP Typ3, które charakteryzowały się wysoką powierzchnią właściwą  $> 150m^2/g$ ”, a tymczasem w tabeli 5 GoHAP Typ2 w ogóle nie występuje a dla GoHAP Typ3 wskazywana powierzchnia właściwa wynosi  $143m^2/g$ . Ponadto, w rozdziale 4.3.1.3. wskazano, że analizy stężenia jonów  $Ca^{2+}$  prowadzono w dniach 1,3,7,9,14, a tymczasem wyniki na Rysunku 18 podane są dla dni 1,3,6,8,11. Mając na uwadze powyższe nie do końca uzasadnionym jest podsumowanie na stronie 75, w którym Doktorantka odnosi wyniki z publikacji [270] dla próbek GoHAP bezpośrednio do próbek GoHAPmed.

Podobnie, jak w przypadku pytania powyżej, bardzo proszę o określenie, jaki wkład merytoryczny został wniesiony przez Doktorantkę w opracowanie procesu ultradźwiękowego nanoszenia powłok nazwanego w pracy metodą SonoNanoCoating (SNC)? Na stronie 50 Doktorantka pisze, że opracowała procedury pokrywania powierzchni implantów medycznych warstwą nHAP zgodnie z wymaganiami normy ISO 13485. Na czym polegało to opracowanie?

- 6) Czym jest „Typ 1” GoHAPmed”? Nie ma dla niego żadnych parametrów (str. 44). W jaki sposób dobrano parametry syntezy dla poszczególnych typów nanocząstek hydroksyapatytu? Ich rozrzut jest duży i nie widać w nich żadnej zależności a bynajmniej w pracy nie zawarto sposobu/uzasadnienia ich doboru.

Dobłą przejrzystość dawałoby podanie w tabeli 1. jakie są właściwości (podstawowe parametry) nanocząstek GoHAPmed uzyskiwane w efekcie zastosowania zmiennych parametrów wytwarzania. Jak się ma Tabela 1 (str. 44) do Tabeli 5 (str. 70), jeśli w tej



pierwszej dla GoHAPmed Typ 1 nie są przypisane żadne wartości a w Tabeli 5 nie widnieje Typ2? Typ 2 nie jest również wskazywany w dalszych badaniach – pomiary adhezji (AFM, podrozdział 4.3.2.6) dla próbek wytwarzanych dla podłoży tytanowych grade 2 nie wskazują czasu wytwarzania dla Typ2, jak również nie ma dla niego wyników (Rys. 15, 16, Tabela 4, 5).

- 7) Dlaczego amplitudę procesu ultradźwiękowego, jego temperaturę oraz koncentrację nanocząstek w zawieszynie GoHAPmed dobierano wykonując procesy na próbkach rusztowania kostnego (jak ono wyglądało, jakie były wymiary, kształt, stan powierzchni) wykonanych techniką druku 3D, podczas gdy analizę wpływu wielkości nanocząstek oraz czasu procesu przeprowadzono na pastylkach PCL wykonanych z ręcznie z materiału od innego dostawcy? Skąd, w tej drugiej części decyzja o zastosowaniu Typu 3 i Typu 6 GoHAPmed?
- 8) W procesach prowadzonych w celu regulacji amplitudy i temperatury procesu ultradźwiękowego SonoNanoCoating oraz regulacji koncentracji nanocząstek w zawieszynie GoHAPmed zastosowano próbki rusztowań kostnych wykonane w technice druku 3D z polikaprolaktonu (PCL). W kolejnych etapach analiz (wpływ wielkości nanocząstek oraz czasu procesu SNC) zastosowano próbki w postaci pastylek PCL wykonane „ręcznie” z granulowanego PCL w drodze obróbki termicznej, prasowania i suszenia. Z kolei procesy modyfikacji metodą SonoNanoCoating (opisane w rozdziale 4.2.2.5), mające na celu optymalizację parametrów zmiennych tej metody i wykazanie niezależności jej działania od rodzaju podłoża poddawanego modyfikacji powierzchniowej, prowadzone były na zupełnie innych materiałach i formach próbek aniżeli te, które zastosowano do wyznaczenia poszczególnych parametrów. Ponadto, dla różnych typów podłoży (różniły się również kształtem, wielkością i sposobem wytwarzania) zastosowano odmienne czasy prowadzenia procesów, różne Typy GoHAPmed (przekładające się na różne wielkości nanocząstek). Bardzo proszę Doktorantkę o wyjaśnienie założeń przyjętej metodologii prowadzonych procesów doboru parametrów.
- 9) W jaki sposób wynik rozpuszczania powłoki GoHAPmed, ujawniony poprzez analizę ilości jonów  $PO_4^{3-}$  oraz HAP uwolnionych do roztworu 0,1 M HCL (Rys. 24), stanowi o najlepszej efektywności procesu ultradźwiękowego osadzania powłok hydroksyapatytowych wyrażonego poprzez obrazowanie SEM morfologii uzyskanych powłok (Rys. 23)?
- 10) Jakie było uzasadnienie do zastosowania GoHAPmed Typ1 oraz GoHAPmed Typ6 w badaniach prowadzonych dla podłoży stanowiących implanty kręgosłupowe wykonane techniką druku 3D (materiał: Ti64ELI) oraz GoHAPmed Typ1, Typ 3 i Typ4 na podłożach śrub interferencyjnych (materiał: Ti-6Al-4V) mocujących sztuczne więzadła? W pracy zabrakło informacji, jaką techniką zostały wytworzone ww. śruby. Ponadto, zastanowienie budzi również fakt, że dla kolejno opisywanych podłoży, które stanowiły implanty sztucznego więzadła krzyżowego, zastosowano nanocząstki hydroksyapatytu oznaczone jako Typ1, Typ3 i Typ6? Jaki był tutaj powód doboru tych właśnie typów i dlaczego Typ1 nie został wzięty pod uwagę przy badaniach siły adhezji, choć wyniki SEM (Rys. 74 A2-A3 oraz opis na str. 126) wskazują, że dla tego typu uzyskano powłoki

o jednorodnym charakterze, podobnie jak dla Typu3, podczas gdy dla Typu 6 powłoki były wysokoporowate (Rys. 74. C3)? Eliminacja powłok GoHAPmed Typ1 z tych badań jest tym bardziej zaskakująca, że w kolejnych badaniach, jakie prowadzono dla tych powłok, czyli degradacyjnych w PBS i SBF, Typ1 został poddany testom.

- 11) Dla śrub interferencyjnych opisanych w rozdziale 5.3.4 opisano badanie wkręcania tychże śrub (pokrytych powłokami hydroksyapatytowymi) do kości wołowej. W jaki sposób realizowano proces wkręcania, aby zapewnić powtarzalne parametry siły nacisku oraz prędkości wkręcania dla wszystkich rodzajów badanych próbek? Jaki był czas przebywania śrub w kości i skutkiem czego mogło być obserwowane (Rys. 73) przyleganie tkanek do powłoki?
- 12) Bardzo proszę o dodatkowe wyjaśnienia w zakresie przeprowadzonych badań oceny żywotności i stopnia proliferacji komórek osteoblastów hFOB 1.19.
- Co miało na celu przeprowadzenie tego typu badania tylko dla jednego rodzaju podłoża (Ti 3D) w szerszym kontekście oceny skuteczności prowadzonych procesów pokrywania różnych materiałów podłoża powłokami nanohydroksyapatytu, gdzie stosowano różne jego typy?
  - Na jakiej podstawie i co biorąc pod uwagę wytypowano do tej analizy GoHAPmed Ty1, Typ 3 i Typ 6 oraz komercyjny hydroksyapatyt Biocer?
  - W metodyce wskazano, że komórki wysiewano na podłoże w stężeniu  $1 \times 10^5$  komórek/próbkę (przy ocenie żywotności) oraz  $5 \times 10^4$  komórek/próbkę (przy ocenie proliferacji). Nigdzie w pracy nie odnalazłam jednak informacji, jakie były rozmiary krążków drukowanych w technologii PBF (Powder Bed Fusion) ze stopu Ti64ELI, które w tym badaniu stanowiły próbkę. Trudno zatem zweryfikować, jaka ilość komórek została wysiana. Precyzyjnym byłoby podanie ilości komórek w przeliczeniu na powierzchnię próbki. A skoro o tym mowa – jeśli były to próbki o strukturze imitującej powierzchnię implantu kręgosłupa (czyli zgodnej z tą zaprezentowaną na stronie 122 na Rys. 69), a na stronie 64 wskazano, że komórki wysiano na badane podłoże, czy zatem badania żywotności prowadzono w kontakcie bezpośrednim? Jeśli tak, to jaką wysokość miały krążki i jak zapewniono, aby wysiane komórki nie opadły grawitacyjnie na dno dołka?
  - Co ile dni zmieniane było medium hodowlane i jaki to mogło mieć wpływ na pomiar absorbancji przy badaniu proliferacji testem WST-8 po 3 i 5 dniach hodowli?
  - W jaki sposób wnioskowano o wspieraniu proliferacji i jej stopniu w badaniach zaprezentowanych na stronie 137 bez wprowadzenia do układu badawczego prób kontrolnych? Żaden z rysunków (81, 82, 83) nie prezentuje wyników dla kontroli – czy to w zakresie próbek, czy też hodowli komórek.
  - Na podstawie obrazów zaprezentowanych na rysunku 83 nie można wnioskować co do morfologii komórek osteoblastów – efekt barwienia jąder komórkowych, czy też F-aktyny nie jest tutaj w ogóle możliwy do zaobserwowania.
- 13) Tytuł rozdziału 5.3.6 wskazuje na badania i ich wyniki pozwalające na ocenę efektywności zasiedlenia kompozytowych rusztowań kostnych wytworzonych techniką druku 3D pokrytych powłoką GoHAPmed Typ3. Bardzo proszę Doktorantkę o wskazanie, który wynik pozwala na wnioskowanie co do efektywności zasiedlenia?

Zdjęcia pokazane na Rys. 86 wskazują, że komórki MSC hodowane były klasycznie (2D) na dnie naczynia w obecności badanego wydruku. Jak zatem można wnioskować co do zasiedlenia powierzchni badanego wydruku?

Ciekawość Recenzentki budzi również kwestia uzasadnienia wyboru linii komórkowej oraz zastosowania medium wzbogaconego o czynniki wzrostu, jako że brak w pracy wnioskowania w tym zakresie.

Co stanowiło próbkę określoną jako „kontrola” na Rys. 87 w badaniu aktywności metabolicznej testem XTT? Jaka była gęstość wysiania komórek w tym teście i przez jaki czas prowadzono ekstrakcję? Dlaczego absorbancji nie przeliczono w odniesieniu do kontroli negatywnej?

14) Co Autorka rozprawy miała na myśli pisząc we wniosku nr 4, że powłoki można osadzać we wnętrzach struktur komórkowych?

15) Badania na komórkach macierzystych opisane w rozprawie mgr inż. Urszuli Szałaj wykonane zostały dla powłoki GoHAPmed Typ3, dla której (zgodnie z Tabelą 5 na stronie 70) średnia wielkość nanocząstek wynosi 14 nm. Na jakiej podstawie Doktorantka stawia zatem wniosek nr 5, iż „nano-powłoki hydroksyapatytowe osadzone metodą SonoNanoCoating, składające się z nanocząstek GoNAPmed od 10 nm do 42 nm są biogodne i mają pozytywny wpływ na adhezję i proliferację komórek macierzystych”?

**Podsumowując powyższą część recenzji, stwierdzam, że uwagi w niej zawarte mają charakter edycyjny, polemiczny, bądź wynikają z ciekawości natury naukowej i ostatecznie nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy jako całości.**

#### **4. OCENA ROZPRAWY I WNIOSKI KOŃCOWE**

---

Doktorantka w sposób jednoznaczny określiła problem badawczy, poprawnie sformułowała zadania naukowe, które następnie rozwiązała. Kompleksowe podejście, jakie przedstawiła Doktorantka, **świadczy o jej dojrzałości badawczej i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.** Przedstawiona rozprawa wykazuje, że **Doktorantka dysponuje ogólną wiedzą teoretyczną i dorobkiem** o charakterze podstawowym w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria materiałowa.

**Praca doktorska Pani mgr inż. Urszuli Szałaj pt. „Inżynieria nano-powłok hydroksyapatytowych nanoszonych metodą ultradźwiękową na implanty ortopedyczne” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.** Przedstawia ciekawe opracowanie dotyczące rozwoju biomateriałów nowej generacji poprzez ich modyfikację powłokami. Całość pracy została poprawnie zredagowana, jest napisana językiem czytelnym i zwięzłym. Sformułowane przeze mnie uwagi i pytania w żadnym stopniu nie umniejszają mojej wysokiej

oceny merytorycznej recenzowanej pracy. Tym bardziej, że szeroki jest wachlarz zastosowanych metod, które zrealizowano w taki sposób, że wyniki badań uzupełniają się i stanowią opracowanie, które w istotny sposób może wpłynąć na możliwości wytwarzania bioaktywnych powłok modyfikujących biomateriały do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej niosąc za sobą znaczącą wartość aplikacyjną dla współczesnej medycyny.

Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji **rozprawa doktorska pt. „Inżynieria nanopowłok hydroksyapatytowych nanoszonych metodą ultradźwiękową na implanty ortopedyczne” mgr inż. Urszuli Szataj** spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz mieści się w dyscyplinie naukowej inżynieria materiałowa. Biorąc powyższe pod uwagę stawiam wniosek o dopuszczenie rozprawy doktorskiej mgr inż. Urszuli Szataj do publicznej obrony.

*Donata Boušpa*