

Prof. dr hab. inż. Celina Pezowicz
Wydział Mechaniczny
Politechnika Wrocławska
ul. Łukasiewicz 7/9
50-371 Wrocław

Wrocław, 30.01.2024r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. URSZULI SZALAJ „*Inżynieria nano-powłok
hydroksyapatytowych nanoszonych metodą ultradźwiękową na implanty ortopedyczne*”

Promotor: prof. dr hab. Witold Łojkowski

Podstawa opracowywania recenzji: pismo z dnia 6 grudnia 2023 r. Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa prof. dr hab. inż. Małgorzaty Lewandowskiej z prośbą o opracowanie recenzji.

1. ZAKRES ROZPRAWY

W dziedzinie inżynierii tkanki kostnej zaprojektowanie odpowiedniego biomateriału, a co za tym idzie implantu, jest istotnym aspektem, który wymaga wszechstronnego zrozumienia zagadnienia od składu samego materiału, jego właściwości fizyko-chemicznych i wytrzymałościowych aż do struktury naśladującej własności naturalnej kości ludzkiej. Należy również dokładnie rozważyć inne ważne czynniki, takie jak biokompatybilność, powinowactwo komórkowe i wzrost nowej tkanki kostnej na zastosowanych materiałach. W ciągu ostatnich kilku dekad dużą wagę przywiązywano do praktycznego wykorzystania hydroksyapatytu (HA), będącego krystaliczną pochodną fosforanu wapnia, który jest hierarchicznie ułożona pomiędzy włóknami kolagenu, jako substytutu tkanki kostnej. Strategia funkcjonalizacji stosowanych w praktyce materiałów na implanty, z wykorzystaniem hydroksyapatytu, jest wciąż intensywnie rozwijana a sam hydroksyapatyt może służyć jako modyfikator różnych substratów i implantów kostnych w celu poprawy zarówno ich właściwości fizycznych, jak i aktywności biologicznej, w tym zwiększenia dynamiki procesu zrostu kostnego z implantem.

Jednym z ważnych kierunków rozwoju chirurgii tkanki kostnej jest wykorzystanie skafoldów jako elementów wypełniających ubytki kostne i wspomagających układ nośny w przenoszeniu obciążeń, a rosnąca rola metod generatywnych w wytwarzaniu tego rodzaju implantów przyspiesza postęp w tej dziedzinie. Rusztowania kostne, czyli struktury porowate, stają się kluczowym elementem w regeneracji tkanki kostnej, umożliwiając wszechstronne zastosowanie w uzupełnianiu ubytków będących konsekwencją chorób (np. osteoporozy) lub urazów poniesionych w wyniku nieszczęśliwych wypadków czy resekcji nowotworów. Tego typu konstrukcje otrzymywane są obecnie przy wykorzystaniu technik generatywnych. Metody takie jak drukowanie 3D, pozwalają na precyzyjne kształtowanie skafoldów zgodnie z indywidualnymi potrzebami pacjenta. Jednakże, aby zapewnić skuteczną integrację implantu z tkanką kostną, istnieje potrzeba modyfikacji powierzchni stosowanych biomateriałów, m.in.

poprzez pokrywanie ich hydroksyapatytem, który istotnie wspomaga osteointegrację, co przyspiesza gojenie i poprawia stabilność połączenia. Rozwinięcie tekstury powierzchni implantu za pomocą różnych procesów, pozytywnie wpływa na wczesne gojenie, prowadząc do większego stopnia integracji i utrwalenia biomechanicznego. Co więcej oprócz rozwinięcia warstwy powierzchniowej poprzez zwiększenie jej chropowatości także zmiany chemiczne, takie jak włączenie hydroksyapatytu (HA) jako powłoki, prowadzą do powstania powierzchni o własnościach wysoce osteoprzewodzących.

Wprowadzanie innowacyjnych rozwiązań, takich jak modyfikacje powierzchni biomateriałów w tym szczególnie stopów tytanu, jest kluczowe dla dalszego doskonalenia implantów układu kostnego i ich zastosowania w chirurgii ortopedycznej czy neurochirurgii. Rozwój i doskonalenie tych technologii przyczynia się do opracowania skuteczniejszych procedur implantacyjnych, skracając czas rekonwalescencji i poprawiając jakość życia pacjentów.

Z tego względu uzasadnione jest prowadzenie prac mających na celu wykorzystanie powłok hydroksyapatytowych w adaptacji istniejących rozwiązań implantów kostnych w celu uzyskania lepszego dopasowania fizykochemicznego a szczególnie przyspieszenia procesu osteointegracji na granicy implant-kość i dalszego wzrostu kostnego aż do uzyskania stabilnego układu biomechanicznego.

Autorka swoje opracowanie przedstawiła łącznie na 185 stronach maszynopisu zawierającego tekst, tabele, rysunki i załączniki. Rozprawę podzielono na 7 rozdziałów zawierających: wprowadzenie, przegląd literatury, sformułowanie tezy i celu pracy, opis metod badawczych z częścią eksperymentalną, wyniki, dyskusję i podsumowanie. Rezultaty zilustrowano 90 rysunkami i 15 tabelami. Autorka umiejętnie wykorzystała różnorodne formy graficzne, aby zobrazować wyniki przeprowadzanych badań, co znacznie wzbogaca walory poznawcze przygotowanej rozprawy. Dodatkowo praca zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz piśmiennictwa oraz spis rysunków i tabel. Literatura liczy 289 pozycji, poprawnie dobranych, które wykorzystane są w pracy w sposób świadczący o dobrej znajomości podjętej tematyki. Na uwagę zasługuje przytoczenie w piśmiennictwie 5 prac współautorstwa Doktorantki z zakresu realizowanej tematyki oraz jednego zgłoszenia patentowego.

We wprowadzeniu Doktorantka przedstawiła problematykę podjętą w rozprawie. Kolejny rozdział dotyczy przeglądu literatury, chociaż w początkowej części rozdział ten poświęcony jest przedstawieniu podstawowych informacji dotyczących: tkanki kostnej, biomateriałów i wytwarzanych z nich implantów wykorzystywanych w rekonstrukcji ubytków kostnych, co trudno uznać za przegląd literatury z zakresu podejmowanej tematyki badań, a raczej ogólne przedstawienie obszaru w zakresie, którym Doktorantka realizuje swoje prace badawcze. Dopiero analiza dotycząca stanu wiedzy z obszaru modyfikacji powierzchni implantów z zastosowaniem powłok hydroksyapatytowych daje pewien wgląd na stan badań i wiedzy z tego zakresu, co jest istotne ze względu, iż Doktorantka w swoich badaniach wykorzystała połączenie dwóch technologii w celu uzyskania istotnej poprawy jakości nanoszonych powłok hydroksyapatytowych. Jednakże i w tym wypadku analiza ta przeprowadzona jest niezbyt wnikliwie. Podsumowanie tego rozdziału daje pewien niedosyt,

ponieważ brakuje w nim krytycznej analizy stanu wiedzy, z której wynikałyby pewne luki czy problemy wymagające wyjaśnienia na drodze badawczej, na podstawie której można byłoby sformułować cel i tezę dysertacji. Teza pracy, a raczej problemy badawcze, zostały przedstawione szczegółowo w czterech punktach.

Kolejne rozdziały, czwarty i piąty, rozprawy doktorskiej dotyczy badań własnych Autorki. W pierwszym etapie Doktorantka opracowała własną całościową koncepcję metody badawczej, w ramach której zaprezentowała poszczególne etapy przygotowania powłoki hydroksyapatytowej, zaczynając od dwu etapowej syntezy nanocząstek hydroksyapatytu (GoHAPmed) przy wykorzystaniu techniki hydrotermalnej syntezy mikrofalowej. Należy zaznaczyć, że proces ultradźwiękowego osadzania powłok nanocząstek hydroksyapatytu (SonoNanoCoating - SNC), wykonywany był na zaprojektowanym w tym celu oryginalnym stanowisku badawczym, dzięki któremu uzyskano powtarzalność osadzania powłok oraz możliwe było utrzymanie temperatury procesu na stałym poziomie. W analizie procesu nanoszenia uwzględniono m.in. takie czynniki jak: regulacja amplitudy, temperatura i czas trwania procesu ultradźwiękowego SNC, czy też koncentracja nanocząstek w zawiesinie GoHAPmed. Ważnym aspektem badań nad doбором parametrów technologii nakładania powłok było wykorzystanie zróżnicowanych pod względem topografii struktury oraz właściwości fizykochemicznych podłoży. W pierwszym etapie badań wykorzystano płaskie próbki wykonane z tytanu grade 2, z PEEK oraz na próbkach Ti64ELI wykonanych z wykorzystaniem technologii przyrostowych, na których osadzano wszystkie typy wielkości nano-hydroksyapatytu. Następnie wykorzystano implanty, stosowane w praktyce medycznej, tj. implanty kręgosłupowe w postaci cage międzytrzonowego i śrub mocujących, implanty więzadła krzyżowego stawu kolanowego oraz rusztowań kompozytowych (PCL/HAP/TCP) wykorzystywanych w regeneracji ubytków tkanki kostnej. Badania wykonane na rzeczywistych obiektach są szczególnie cenne, gdyż dostarczają wiedzę o efektywności przeprowadzonej modyfikacji implantów i możliwości wykorzystania tak zmodyfikowanych elementów zastępczych w procesie leczniczym. W tym samym rozdziale Autorka scharakteryzowała metody zastosowane w opisie parametrów fizycznych, chemicznych i strukturalnych uzyskanych powłok. Uważam za bardzo cenne przeprowadzenie badań na hodowlach komórkowych, w tym ocenę żywotności osteoblastów i ich proliferacji, przeprowadzoną na przestrzennych rusztowaniach ze stopu tytanu modyfikowanych powłokami hydroksyapatytowymi oraz żywotności oraz efektywności zasiedlenia kompozytowych rusztowań kostnych modyfikowanych powłoką GoHAPmed Typ 3 przez komórki macierzyste. Badania te umożliwiają ocenę pełnej funkcjonalności przeprowadzonych modyfikacji i możliwości ich zastosowania w dalszych badaniach przedklinicznych, co stanowi praktyczny aspekt prowadzonych badań.

Wyniki badań zaprezentowane w rozdziale 5, umożliwiły Autorce zidentyfikowanie metody mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek jako narzędzia do regulacji ich wielkości. Charakterystyka nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed, uzyskanych za pomocą tej metody wykazała, że ich rozmiar ma istotny wpływ na cechy takie jak: powierzchnia właściwa, gęstość, pojemność sorpcyjna oraz uwalnianie jonów Ca^{2+} . Precyzyjna regulacja tych parametrów może być kluczowa dla osiągnięcia pożądanych właściwości nano-powłok hydroksyapatytowych, nanoszonych za pomocą techniki SonoNanoCoating. Dodatkowo

Doktorantka wykazała, że nano-powłoki hydroksyapatytowe osadzone metodą SNC mogą być stosowane jako warstwa zarodkowa przyspieszająca powstawanie powłoki biomimicznego hydroksyapatytu metodą dip coating.

Zastosowane w pracy metody badawcze należy oceniać bardzo pozytywnie. Autorka udokumentowała przeprowadzenie szeregu prac właściwych do rozwiązania postawionego problemu badawczego, pomiarów i analiz instrumentalnych, umożliwiających dokonania wielu istotnych obserwacji technologicznych i sformułowania pewnych wniosków ukierunkowanych na ich praktyczne wykorzystanie.

Wyniki wraz z dyskusją przeprowadzonych badań i analiz przedstawiono w rozdziale szóstym, wskazując na osiągnięcie stawianych w pracy celów szczegółowych potwierdzających tezę pracy, iż połączenie technologii mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek oraz ultradźwiękowego nanoszenia powłok otwiera nowe możliwości nano-inżynierii i przełamanie ograniczeń w obecnie stosowanych metodach pokrywania powierzchni implantów. Ciekawym wnioskiem płynącym z przeprowadzonych badań jest szansa zastosowania nano-powłoki, jako warstwy zarodkowej do tworzenia biomimetycznych powłok hydroksyapatytowych, które dodatkowo mogą pełnić funkcję dostarczania leków. Im mniejsze nanocząstki użyte w warstwie zarodkowej, tym większe rozwinięcie powierzchni właściwej, co umożliwia zwiększenie ilości leku do dyfuzji, co z kolei prowadzi do osiągnięcia wyższego stężenia leku w docelowej powłoce biomimetycznej. Dzięki temu, implanty wyposażone w takie funkcjonalne powłoki mogą zapewnić nie tylko skuteczniejszy zrost kostny, ale także precyzyjne dostarczanie leków na miejsce działania, co może być kluczowe w terapii wielu schorzeń tkanki kostnej. Na tym etapie widoczna jest szeroka wiedza Autorki dotycząca podejmowanego tematu. Interpretacja uzyskanych rezultatów, przedstawiona przez Doktorantkę, świadczy o umiejętności formułowania wniosków i dojrzałości naukowej.

Przeprowadzona analiza stanu wiedzy, przedstawiona problematyka i zaproponowany sposób rozwiązania podjętych zagadnień pozwala stwierdzić, iż wybrany przez Doktorantkę temat jest w pełni uzasadniony oraz aktualny poznawczo i aplikacyjnie.

Recenzowana rozprawa mieści się w dyscyplinie naukowej inżynieria materiałowa a podjętą w niej problematykę można zaliczyć do istotnego nurtu rozwoju współczesnej bioinżynierii.

2. OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

W przedstawionej do recenzji rozprawie Doktorantka proponowała oryginalne podejście do rozwiązania problemu dotyczącego nakładania nano-połwok hydroksyapatytowych na implanty układu kostnego, których zadaniem jest przyspieszenie procesu zrostu kostnego i uzyskanie stabilnego połączenia na granicy implant-kость. Ta nowatorska koncepcja może znacząco wpłynąć na rozwój technik implantologicznych oraz poprawę skuteczności leczenia pacjentów z uszkodzeniami układu nośnego.

Na podstawie przeanalizowanej literatury dotyczącej podjętego problemu postawiono tezę, iż: „*Połączenie technologii mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek oraz ultradźwiękowego nanoszenia powłok otwiera nowe możliwości nano-inżynierii i przełamanie ograniczeń w obecnie stosowanych metodach pokrywania powierzchni*

implantów hydroksyapatytem” wskazując cztery czynniki, poprzez które ma zostać ona uzyskana, tj.:

1. Regulację wielkości nanocząstek w powłokach hydroksyapatytowych, co daje nowe perspektywy w dziedzinie modyfikacji powierzchni implantów ortopedycznych.
2. Uzyskanie jednorodnych powłok hydroksyapatytowych obecnych zarówno na powierzchniach zewnętrznych jak i wewnątrz porowatych struktur 3D oraz materiałach włóknistych.
3. Osadzanie nano-powłok w niskich temperaturach, co umożliwia modyfikację powierzchni materiałów wrażliwych na temperaturę oraz zachowanie właściwości nanohydroksyapatytu.
4. Wykorzystanie wszechstronności metody i dobór parametrów osadzania nano-powłok niezależnie od rodzaju, kształtu i struktury modyfikowanego materiału.

Wobec tak przedstawionej tezy Autorka wyznaczyła cele szczegółowe dotyczące przede wszystkim opracowania metody, w tym stanowiska badawczego, osadzania nano-powłok hydroksyapatytowych i określenie parametrów wpływających na jej właściwości.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy chciałabym zaliczyć:

- dobór parametrów i całościowe opracowanie technologii umożliwiającej nakładanie powtarzalnych nano-powłok hydroksyapatytowych (nie zmieniającej struktury krystalicznej hydroksyapatytu użytego w procesie) na zróżnicowanych pod względem topografii (struktury komórkowe/struktury włókniste) i zastosowanego materiału podłożu;
- zidentyfikowanie metody mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed jako narzędzia do regulacji ich wielkości;
- opracowanie procedury pokrywania powierzchni implantów medycznych warstwą nHAP, zgodnie z wymaganiami normy ISO 13485 dla wyrobów medycznych, które zostały wdrożone w certyfikowanym Systemie Zarządzania Jakością (certyfikat numer PL55499H);
- przeprowadzenie cyklu badań i analiz wpływu różnych parametrów na właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne zastosowanych na powłoki hydroksyapatytowe;
- umiejętne wykorzystanie różnych metod badawczych i analitycznych, w celu realizacji postawionych zadań badawczych;
- wyrażenie sformułowane cele badawcze i teza oraz konsekwentnie rozwiązane zadania szczegółowe.

Podsumowując tę część recenzji stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa zawiera cenne aspekty poznawcze. Pracą swoją Doktorantka włączyła się w bardzo ważny nurt badań nad rozwojem nowych technologii materiałowych w zastosowaniach medycznych, w tym szczególnie wykorzystywanych w procesie regeneracji tkanki kostnej. Doktorantka wykazała się gruntowną znajomością tematyki oraz dojrzałością w rozwiązywaniu bardzo złożonych problemów badawczych i naukowych.

Rozprawa ma charakter interdyscyplinarny, w której rozwiązany został jeden z problemów badawczych, a którego wyniki mogą być z powodzeniem wykorzystywane w praktyce klinicznej, wspomagając a nawet przyspieszając proces regeneracji tkanki kostnej po wprowadzeniu implantu do układu nośnego.

3. UWAGI KRYTYCZNE I DYSKUSYJNE

Chciałabym przedstawić pewne wątpliwości i uwagi krytyczne, które nasunęły mi się po zapoznaniu się z recenzowaną pracą. Najważniejsze z nich to:

1. W rozprawie brak jest krytycznej oceny obecnego stanu wiedzy z zakresu podjętego tematu, co umożliwiłoby wykazanie ewentualnych braków czy luk w wytwarzaniu nano-powłok hydroksyapatytowych na różne biomateriały i implanty, co jednoznacznie wskazywałoby na konieczność podjęcia dalszych badań nad rozpatrywanym zagadnieniem.
2. W rozdziale 2.3 Doktorantka stwierdza, że: „Osteointegracja obejmuje głównie kilka kluczowych punktów opisanych jako: – stabilność protezy pod skutecznym obciążeniem”, co to jest skuteczne obciążenie protezy?
3. Jeden z celów szczegółowych przedstawionych w punkcie 3.2. dotyczy „optymalizacja metody ultradźwiękowego osadzania nano-powłok pod kątem wytwarzania powłok hydroksyapatytowych ... „. Natomiast w żadnym miejscu nie określono według jakich kryteriów był prowadzony proces optymalizacji, jaki parametr czy parametry świadczyły, iż uzyskane rezultaty są tym optimum. Poza tym słowo „optymalny” (względem czego) lub „optymalizacja” (według jakich kryteriów) pojawia się dość często w pracy i jest nadużywane.
4. Doktorantka przeprowadziła szereg badań, charakteryzujących wpływ różnych parametrów syntezy hydroksyapatytu i technologii jego wytwarzania na nano-powłoki. Natomiast brakuje wyznaczenia parametrów mechanicznych, na podstawie których można byłoby stwierdzić wytrzymałość powłoki na obciążenia, którym poddawane są implanty. W dysertacji wykonane zostały jedynie badanie przy pomocy testu zarysowania z zastosowaniem AFM, które jednak nie charakteryzują układu implant-powłoka w różnych stanach odkształcenia, a jedynie wskazuje na adhezję i kruchość samych powłok, a nie podłoża z powłoką. Pewną odpowiedź na to zagadnienie mógłby dać podstawowy test na ściskanie w przypadku cage międzytrzonowych czy test na jednoosiowe rozciąganie przy implantach więzadeł krzyżowych. Oczywiście zrozumiałe jest, iż przy tak obszerne poprowadzonym programie badań, jaki zrealizowała Doktorantka, podejmowanie kolejnych zagadnień odsuwa końcowy cel w czasie, jednakże w mniemaniu Recenzenta istotnie wpłynęłoby to na wykazanie trwałości przylegania powłoki w warunkach obciążenia mechanicznego jakim poddawane są implanty układu nośnego człowieka.
5. Na jakiej podstawie wytypowano i zastosowano GoHAPmed Typ 3 (z 6 typów) w badaniach regulacji amplitudy, temperatury czy koncentracji nanocząsteczek procesu ultradźwiękowego SNC?
6. Z czego wynikał dobór interwałów czasowych (60 i 90 dni), w trakcie których analizowano procesy zachodzące w czasie badań nad degradacją powłok hydroksyapatytowych? Jakie parametry oceniano?
7. Dysertacja zawiera bardzo obszerne wyniki badań z różnych obszarów działań eksperymentalnych. Niestety odczuwam pewien niedosyt w analizie tych wyników pod względem statystycznym. Doktorantka nie przedstawiła jakiego rodzaju testy były wykorzystywane w analizie statystycznej (jeśli w ogóle), czy wykazano różnice

w wynikach o założonej istotności statystycznej. Bez analizy istotności statystycznej raczej trudno wnioskować, że dany parametr jest kluczowy dla uzyskania fundamentalnej zmiany w wytwarzanej powłoce. Prezentowane wykresy nie posiadają wyjaśnian jakiego rodzaju informacje zawierają (np.: średnia, odchylenie średniej, odchylenie standardowe ?).

8. W pracy brakuje przeprowadzenia dyskusji naukowej uzyskanych wyników własnych na tle wyników prezentowanych w literaturze tematu. Oczywiście wyniki badań są szeroko przeanalizowane i ciekawie zinterpretowane, a w ostatnim rozdziale podsumowane, jednakże to nie zastąpi dyskusji, która wskazuje jak wyniki uzyskane w badaniach własnych prezentują się na tle innych autorów.

Przedstawione uwagi w niczym nie umniejszają pozytywnej oceny merytorycznej recenzowanej rozprawy doktorskiej. Wykonane badania cechuje: wystarczająca systemowość, rzetelność i dogłębna analiza, dostarczająca uzyskanym wynikom niezbędne wiarygodności. Przedstawione w recenzji uwagi mają głównie charakter wskazówek metodologicznych, dotyczących niezbędnej precyzji używanych sformułowań oraz charakter dyskusji naukowej, mającej na celu doprecyzowanie pewnych niejasności.

4. WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zawiera cenne aspekty poznawcze dyscyplinie inżynieria materiałowa. Praca będąc oryginalnym rozwiązaniem postawionego zadania badawczego stanowi autorski wkład naukowy w zakresie inżynierii materiałowej opartej na nowych rozwiązaniach materiałowych i technologicznych. Dobór technik badawczych i umiejętne posługiwanie się nimi wskazuje na dobre przygotowanie Doktorantki do samodzielnego prowadzenia badań naukowych z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych i umiejętności krytycznej analizy wyników.

Biorąc pod uwagę przedstawiony mi do zaopiniowania materiał, oryginalność rozwiązanego w rozprawie, istotnego zagadnienia naukowego, a tym samym fakt potwierdzenia umiejętności prowadzenia pracy naukowej i badawczej przez Doktorantkę uważam, że przedłożona rozprawa może służyć za podstawę do rozpatrzenia wniosku o nadanie Kandydatce stopnia doktora nauk technicznych. Wobec spełnienia wszystkich wymogów odpowiedniej Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 (Dz.U. 2003 nr 65 poz.595) z późniejszymi zmianami wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Urszuli Szałaj do publicznej obrony opiniowanej pracy w dyscyplinie inżynieria materiałowa.

