

Kraków, 11.10.2017 r.

dr hab. Jan Zawała
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. J. Habera
Polskiej Akademii Nauk
e-mail: nczawala@cyfronet.pl
tel: 12 6395133

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Yingdi Yan

pt. "Investigation of implants in aspect of their adhesion to biological materials"

Promotor: dr hab. Aleksandra Szcześ

Wstępna charakterystyka pracy

Oceniana praca doktorska, której tematyka leży na przecięciu obszarów zainteresowań chemii i biologii, dotyczy wpływu modyfikacji powierzchni ciała stałego na fizykochemiczne parametry powierzchniowe, kluczowe w ocenie biokompatybilności i możliwości potencjalnego wykorzystania aplikacyjnego danego materiału w zastosowaniach biomedycznych. Jest to zagadnienie szczególnie ważne z punktu widzenia rosnącego zapotrzebowania na bezpieczne i długotrwałe implanty kostne. Bardzo ważnym parametrem charakteryzującym procesy zachodzące na granicach faz (w przypadku implantów kostnych na granicy organizm człowieka/powierzchnia implantu), są parametry powierzchniowe (tj. zwilżalność, określająca właściwości hydrofilowo-hydrofobowe, praca adhezji) od których zależy m. in. adhezja i adsorpcja białek i komórek biologicznych oraz ich namnażanie i struktura tworzących się warstw na powierzchni ciała stałego. Nie bez znaczenia w tych procesach jest również topografia powierzchni (szorstkość).

Celem pracy doktorskiej było zbadanie właściwości powierzchniowych materiałów stosowanych do produkcji implantów modyfikowanych warstwami lipidowymi. Zagadnienia badawcze podjęte przez Doktorantkę są nie tylko interesujące naukowo, lecz przede wszystkim bardzo ważne ze względów praktycznych. Dlatego wybór tematyki pracy doktorskiej uważam za w pełni uzasadniony. Dysertacja stanowi kontynuację mających duże uznanie na świecie badań prowadzonych w zespole, w którym pracuje Promotor pracy.

Ocena konstrukcji i zakresu pracy

Oceniana praca doktorska jest obszernym opracowaniem (liczącym w sumie 190 stron plus 9 stron aneksu z opisem skrótów i symboli) napisanym w języku angielskim, zawierającym bogaty materiał ilustracyjny (zdjęcia, wykresy, schematy i diagramy) oraz imponujący spis literatury cytowanej (330 pozycji). Pracę podzielono na cztery główne części. Po krótkim wstępie (rozdział nr 1) rozpoczyna się część pierwsza, tj. przegląd literaturowy, który stanowi około 30% całości rozprawy doktorskiej. Opis celu pracy (rozdział 6 - *Aim of the Thesis*) wyodrębniono jako osobną część nr 2. Część trzecia jest częścią eksperymentalną, zawierającą, oprócz opisu uzyskanych wyników, rozdział 7, tj. *Materials and Methods*. Rozprawę kończy część nr 4, zatytułowana „*Conclusions*”. Pracę uzupełniono o elementy

wymagane w publikacji tego typu tj. spis treści, streszczenie w języku angielskim i polskim, spis własnych publikacji oraz spis cytowanej literatury. Osobno dołączono spis symboli i skrótów, który, ze względu na fakt, że Doktorantka w swojej pracy używa ich bardzo dużo, znacznie ułatwia czytanie tekstu.

Część literaturowa obejmuje wsparty rysunkami i schematami, opis struktury błony komórkowej, jej składników i funkcji, ze szczególnym uwzględnieniem budowy i właściwości fizykochemicznych lipidów oraz metod używanych do tworzenia dwu-warstw lipidowych na powierzchni ciała stałego. Autorka charakteryzuje także materiały znajdujące zastosowanie jako implanty kostne, kładąc główny nacisk na fizykochemiczne właściwości tytanu i jego stopów (z aluminium i wanadem) oraz hydroksyapatytu, tj. głównych materiałów, które wykorzystywała podczas pracy eksperymentalnej. Opisuje dokładnie i krytycznie istniejące metody modyfikacji biokompatybilności powierzchni implantów poprzez nakładanie warstw fosfolipidowych, hydroksyapatytowych oraz polimerowych (*polymer brush*). Rozdziały opisujące te zagadnienia są przystępnie i klarownie napisane i w moim odczuciu stanowią bardzo dobre kompendium i przegląd dostępnego obecnie stanu wiedzy. Szczególnie dokładnie opisano metody tworzenia warstw polimerowych, z uwzględnieniem krytycznej dyskusji ich wad i zalet oraz istniejących i potencjalnych zastosowań praktycznych. W ostatnim rozdziale części literaturowej opisane są podstawy teoretyczne i metodologia pomiarów kątów zwilżania oraz przedstawione są podstawy i metody obliczania energii powierzchniowej.

Opisując cel pracy (*Aim of the Thesis*), Autorka pokrótce charakteryzuje trzy główne ścieżki badawcze, które realizowała, definiując cel badań oraz wymieniając wszystkie używane techniki eksperymentalne i teoretyczne. Oprócz zdefiniowania celu pracy Autorka stara się również przedstawić motywację podjęcia badań. W moim odczuciu rozdział nr 6 jest zbyt obszerny, głównie dlatego, że Doktorantka wymienia szczegółowo metody eksperymentalne i teoretyczne, jakie zamierza stosować. Moim zdaniem, w rozdziale tym powinna skupić się bardziej na dokładniejszym opisie motywacji prowadzenia swoich badań, uzasadniając konieczność ich podjęcia w świetle istniejącego stanu wiedzy – używane techniki badawcze i tak szczegółowo opisane są w rozdziale 7, tj. „*Materials and Methods*”. Brakuje w tym miejscu również wyraźnego i bezpośredniego sformułowania hipotez badawczych, które zawsze stanowią pożądany element rozprawy doktorskiej.

Część eksperymentalną poprzedza opis wykorzystanych urządzeń badawczych, procedur pomiarowych i użytych materiałów i odczynników. Opis metodyki jest wyczerpujący, a na szczególną uwagę zasługuje imponująca różnorodność stosowanych technik doświadczalnych, wskazująca na interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań i dużą wiedzę Doktorantki. W części eksperymentalnej znajduje się prezentacja uzyskanych wyników wraz z ich interpretacją i dyskusją. Autorka zamieszcza dyskusję bezpośrednio pod każdym z prezentowanych wyników. Pracę w takiej formie dość dobrze się czyta, jednak traci na tym odbiór pracy jako całości, gdyż nowe i istotne obserwacje są przeplatane wynikami i wnioskami oczywistymi, o mniejszej wadze poznawczej. Autorka ma często tendencje do sugerowania wniosków przed przedstawieniem wyników swoich badań (np. w rozdziale 8.3 na stronie 96) lub powtarzania w większym lub mniejszym stopniu podstaw teoretycznych użytej metody badawczej zaraz przed opisem wyników (np. rozdział 9.2 na stronie 115 lub fragment tekstu nad rys. 10.8 na stronie 144, dotyczący metod obliczania energii powierzchniowej). Przypominanie podstaw teoretycznych metod lub ich charakterystyka jest niepotrzebne, ponieważ wszystkie techniki badawcze zostały opisane już w rozdziale 7. Dodatkowo rysunki takie jak np. rys. 8.16 (gdzie Doktorantka przedstawia bardzo dużą ilość zdjęć powierzchni, dla każdego podając kilka różnych parametrów, w tym konkretnym przypadku charakteryzujących szorstkość) powinny być,

moim zdaniem, ze względu na ilość prezentowanych danych, wsparte Tabelą. Pozwoliłoby to w bardziej przyjazny dla czytelnika sposób analizować otrzymane przez Doktorantkę wyniki. Te drobne niedociągnięcia rekompensują jednak krótkie podsumowania najważniejszych wniosków, podane po opisie wyników i dyskusji określonego etapu badań, które systematyzują tekst i ułatwiają jego odbiór. Pracę kończy rozdział „Conclusions”, w którym Doktorantka podsumowuje najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań.

Ze względu na obszerny zakres prac doświadczalnych oraz przebadanych parametrów i wariantów, nie sposób odnieść się w niniejszej recenzji do wszystkich zaprezentowanych wyników. To co jednak warto podkreślić, to właśnie kompleksowe podejście, jakie zastosowano do istotnie złożonego zagadnienia badawczego. Pozwoliło to na szczegółowe przeanalizowanie wpływu szeregu czynników (ilość i sposób nakładania warstw lipidowych, topografia powierzchni materiału, czas oczyszczania powierzchni materiału w plazmie, rodzaj cieczy odmywającej, rodzaj elektrolitu, źródło hydroksyapatytu, stężenie monomeru) na zwilżalność, energię powierzchniową stabilność i właściwości elektrokinetyczne modyfikowanych warstwami biologicznymi powierzchni stopu tytanu i hydroksyapatytu, a także pozwoliło określić potencjał wytwarzanych w kontrolowany sposób warstw polimerowych do zastosowań przeciwprzerostowych. Zastosowane podejście eksperymentalne oraz dobór metod i przeanalizowanych parametrów doświadczalnych świadczy o wysokim poziomie umiejętności Doktorantki, zarówno merytorycznych jak i eksperymentatorskich. W samej metodyce badawczej za szczególnie interesujące można uznać pomiary zwilżalności czystego hydroksyapatytu oraz hydroksyapatytu modyfikowanego warstwami fosfolipidowymi metodą „thin layer wicking”, opartą na pomiarze szybkości penetracji cieczy w porowatej warstwie ciała stałego. Użycie tej metody wykazało jej bardzo duży potencjał do określania energii powierzchniowej sproszkowanych biomateriałów.

Do najważniejszych osiągnięć pracy można zaliczyć także:

1. bezpośrednie wykazanie, że dla niezmodyfikowanej powierzchni badanego stopu tytanu oddziaływania elektrono-donorowe zależą od topografii powierzchni (są tym większe im mniejsza jest jej szorstkość), w przeciwieństwie do oddziaływań dyspersyjnych, na które topografia powierzchni praktycznie nie ma wpływu,
2. wykazanie, że rodzaj rozpuszczalnika organicznego użytego do osadzania warstw fosfolipidowych na powierzchni syntetycznego i naturalnego hydroksyapatytu zmienia właściwości powierzchniowe otrzymanych warstw,
3. wykazanie, że powierzchnie pokryte wytworzoną w kontrolowany sposób warstwą polimerową (*polimer brush*) wykazują odporność na niepożądaną adsorpcję białka (BSA), która zależy nie tylko od wartości energii swobodnej i szorstkości powierzchni, ale także od konformacji łańcuchów polimerowych.

Merytorycznie recenzowaną pracę oceniam wysoko, zarówno ze względu na odpowiednie podejście metodyczne do złożonego problemu badawczego, jak wartość praktyczną uzyskanych rezultatów. Zostało to potwierdzone przez fakt, że wyniki cząstkowe stały się podstawą 7 artykułów naukowych, albo już opublikowanych w renomowanych czasopismach o cyrkulacji międzynarodowej (m.in. *Colloids Surfaces A., Materials Science & Engineering, Surface Innovations* - 4 prace), albo będących w przygotowaniu (2 prace) lub recenzjach (1 praca).

Uwagi polemiczne oraz redakcyjne

Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się jedynie kilka uwag o charakterze dyskusyjnym, które w żadnym stopniu nie obniżają mojej pozytywnej oceny.

Prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie i/lub komentarz do następujących kwestii:

1. W rozdziale 8.2.2 na stronie 103 Doktorantka opisuje wpływ warstw DPPC (*dipalmitylofosfatydylocholiny*), otrzymywanych różnymi metodami na powierzchni stopu tytanu na obliczoną pracę adhezji dla wody i diiodometanu. Zauważa, że hydrofobowość powierzchni rośnie w szeregu metod nakładania lipidów przedstawionym na osi x. Nie zwraca uwagi jednakże na bardzo istotną, moim zdaniem, zmianę badanego parametru, którą można zaobserwować porównując wartości pracy adhezji dla wody i cieczy organicznej w badanym szeregu. Można zaobserwować, że lepszą zwilżalność przez wodę w porównaniu z cieczą organiczną wykazuje czysta powierzchnia stopu, natomiast efekt ten ulega odwróceniu dla stopu tytanu z mono-warstwą nałożoną metodą LB. Obserwacja ta potwierdza przypuszczenia co do orientacji cząsteczek DPPC na powierzchni.
2. W rozdziale 8.3.2 Doktorantka opisuje obserwacje dotyczące struktury mono- i dwu-warstw DPPC na powierzchni stopu tytanu i zauważa, że po okresie 2 godzin, podczas których płytkę metaliczną z naniesionymi warstwami zanurzona była w wodzie, doszło do reorientacji cząsteczek i znacznego „wygładzenia” powierzchni (spadku szorstkości). Jakie było pH wody, którą Doktorantka używała do tego eksperymentu? Czy woda była nasycona dwutlenkiem węgla z powietrza przed eksperymentem? Czy możliwe jest, że rozpuszczający się w wodzie, podczas eksperymentu, CO₂ zmienił się jonową roztworu i spowodował zmianę w strukturze warstw?
3. W jaki sposób obliczane było pokrycie powierzchniowe w badaniach adsorpcji BSA?

Praca jest napisana poprawnym językiem i starannie zredagowana. Dostrzegłem jedynie nieliczne błędy:

- na stronie 56, w linii 6, w zdaniu „... *most of the substances are characterized small value of ...*”, powinno być „... *most of the substances are characterized by small value ...*”,
- na stronie 59, w linii 10, wystąpił błąd literowy w słowie “*precontacted*”),
- lepkość dynamiczna cieczy podana jest w jednostkach CGS (cP) a nie w SI (Pa·s) (Tabela 5.1 na stronie 62),
- na stronie 90 w podpisie pod rysunkiem 8.10 napisano „... *the roughness parameters R_w , R_q and R_r are the same as i Table 8.1 ...*”. Zapewne chodziło o to, że znaczenie symboli, a nie same parametry są identyczne,
- na stronie 116 pod rysunkiem 9.4 napisano, że „... *generally the synthetic sample has a lower zeta potential compared with the natural one ...*” – jak wynika z wykresu 9.4 efekt ten zależy od zakresu pH, a stwierdzenie to jest słuszne tylko dla pH mniejszego od ca. 5,
- Na stronie 147, na początku rozdziału 10.3 napisano, że „... *the bovine serum albumine (BSA) adsorption was performed using the UV/Vis method ...*”. Zapewne chodziło o to, że adsorpcja BSA (pokrycie powierzchniowe) monitorowana była za pomocą wymienionej metody spektroskopowej,
- Na stronie 148 w dyskusji wyników przedstawionych na rys. 10.11, przed podaniem parametrów próbki najlepiej spełniającej zadanie antyadhezyjne dla cząsteczek BSA (grubość warstwy, gęstość szczepienia) Doktoranta powinna wskazać konkretnie o którą próbkę chodzi, odwołując się bezpośrednio do danych z wykresu 10.11.

Wniosek końcowy

Przedstawiona praca doktorska pt. „*Investigation of implants in aspect of their adhesion to biological materials*” stanowi oryginalne rozwiązanie złożonego i interdyscyplinarnego problemu naukowego. Jest dobrze zrealizowana od strony eksperymentalnej, koncepcyjnej i interpretacyjnej oraz udowadnia, że Doktorantka posiada dużą wiedzę teoretyczną i odznacza się samodzielnością badawczą, zarówno w zakresie prowadzenia doświadczeń, jak i interpretacji wyników. W mojej opinii rozprawa odpowiada warunkom określonym w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wniosuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.