



Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa



prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. inż. Marcin Sobczak

Tel: (+48 22) 57 20 784; E-mail: marcin.sobczak@wum.edu.pl

Warszawa, dn. 09.08.2023 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Kacpra Przykazy pt. "Charakterystyka fizykochemiczna i ocena biokompatybilności filmów wybranych substancji bioaktywnych osadzonych na powierzchni PEEK lub PEEK/bioszko" wykonanej w Katedrze Zjawisk Międzyfazowych Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Przedstawiona do oceny praca doktorska pt. "Charakterystyka fizykochemiczna i ocena biokompatybilności filmów wybranych substancji bioaktywnych osadzonych na powierzchni PEEK lub PEEK/bioszko" wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Wiącek, prof. UMCS (promotor) oraz Pani dr hab. Małgorzaty Jurak, prof. UMCS (promotor pomocniczy), stanowi cykl dziesięciu publikacji. Jest ona kontynuacją badań nad powierzchniową immobilizacją różnych biomateriałów prowadzonych od wielu lat przez Zespół kierowany przez Panią Profesor Agnieszkę Wiącek.

Jak powszechnie wiadomo, badania nad otrzymywaniem wielofunkcyjnych filmów na podłożu stałym z wykorzystaniem techniki Langmuira-Blodgett (LB), których celem jest m.in. wzmocnienie adhezji i procesu proliferacji osteoblastów, wspomaganie procesu gojenia się ran, redukcja stanu zapalnego, kontrolowane uwalnianie substancji leczniczych, zmniejszenie prawdopodobieństwa wystąpienia skutków ubocznych terapii oraz zmniejszenie ewentualnej toksyczności samego biomateriału lub produktów jego dekompozycji, stanowią bardzo ważny obszar współczesnej nauki.

Przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej były biomateriały na bazie polieteroeteroketonu (PEEK) o zwiększonej biokompatybilności o potencjalnym zastosowaniu jako materiały kośćozastępcze. Jako główny cel pracy, Doktorant postawił sobie zaprojektowanie i otrzymanie wspomnianych biomateriałów. Założył, że aktywacja powierzchni PEEK zimną plazmą powietrzną, a następnie jej pokrycie filmami substancji bioaktywnych wpłynie na zmianę topografii, polarności oraz składu chemicznego powierzchni,

M. Sobczak

i docelowo możliwa będzie kontrola tych parametrów w oparciu o odpowiedni dobór rodzaju nanoszonego filmu. Dodatkowo przyjął założenie, że zwiększy to biogodność PEEK nie zmieniając jednocześnie jego bardzo dobrych właściwości mechanicznych porównywalnych z właściwościami kości ludzkiej. Jako substancje aktywne wchodzące w skład badanych filmów wykorzystał chitozan (Chit), bioszkle, fosfolipid - 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholinę (DPPC), cholesterol (Chol), cyklosporynę A (CsA) i naproksen (NAP). Magister Kacper Przykaza określił również kilkanaście celów szczegółowych realizowanych w ramach pracy eksperymentalnej. **Stwierdzam, że podjęta przez Doktoranta tematyka wpisuje się w aktualne trendy badań współczesnej chemii, farmacji i inżynierii biomateriałów oraz ma ogromne znaczenia poznawcze i aplikacyjne.**

We wstępie dysertacji doktorskiej, Autor przedstawił krótkie studium dotyczące problematyki urazów i chorób tkanki kostnej oraz opracowywania nowych materiałów implantacyjnych stanowiących substytuty kości. Doktorant opisał dotychczas stosowane rozwiązania w zakresie implantologii z wykorzystaniem głównie materiałów wykonanych ze stopów stali nierdzewnej, tytanu, platyny, domieszkowane innymi pierwiastkami (np. węglem, kobaltem, chromem). Autor szczegółowo omówił problemy wynikające ze stosowania tej grupy biomateriałów, tj. możliwość uwalniania jonów metali powodujących metalozę i alergie, generowanie zbyt dużych naprężeń mechanicznych przez implant, zjawisko korozji i jej skutki biologiczne (stany zapalne, różne rodzaje toksyczności, nerkoza itp.). Jak słusznie stwierdził, istnieje konieczność opracowania alternatywnych biomateriałów dla implantów na bazie metali. W dalszej części wstępu, Doktorant scharakteryzował stosunkowo nowy biomateriał produkowany przez firmę InVivo Ltd. - PEEK. Omówił bardzo korzystne z punktu widzenia inżynierii biomateriałów właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne wspomnianego polimeru oraz jego kompozytów z innymi materiałami. Jednocześnie podkreślił, że biokompatybilność PEEK jest następstwem jego wysokiej inertności chemicznej i biologicznej. Obojętność chemiczna z jednej strony jest wysoce pożądana, ponieważ zapobiega korozji i degradacji materiału. Z drugiej jednak strony, bioinertna natura PEEK ogranicza w pewnym stopniu jego optymalne wykorzystanie jako materiału kośćzastępczego, ponieważ osteointegracja na powierzchni polimeru jest nieznaczna. Jak wiadomo, tkanka kostna powinna narosnąć na materiał implantowany tworząc z nim trwałe i mocne połączenie. Jak słusznie stwierdził Doktorant, w przypadku PEEK problem tkwi głównie w hydrofobowej naturze jego powierzchni, co znacząco ogranicza adhezję białek i komórek utrudniając integrację polimeru z tkanką kostną. W związku z powyższym, podejmowanych jest obecnie wiele prac badawczych nad modyfikacją powierzchni biomateriałów otrzymywanych z PEEK. W dalszej części przeglądu literatury, Autor omówił stosowane obecnie chemiczne i fizyczne techniki modyfikacji powierzchni PEEK, które są w stanie zmieniać właściwości warstwy zewnętrznej. Szczególnie dużo uwagi

M. Soban

Doktorant poświęcił procesom osadzania filmów zawierających substancje bioaktywne na powierzchni PEEK. Dokładnie omówił techniki umożliwiające otrzymanie jedno- i wieloskładnikowych wielofunkcyjnych filmów utworzonych na podłożu stałym.

Wstęp pracy doktorskiej dobrze wprowadza czytelnika w tematykę innowacyjnych materiałów implantacyjnych dedykowanych tkance kostnej. Doktorant prawidłowo dokonał selekcji najważniejszego piśmiennictwa oraz bardzo umiejętnie uzasadnił konieczność podjęcia badań stanowiących przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej. Należy również wspomnieć, że rozwinięcie i uszczegółowienie omawianej tematyki stanowi przedmiot publikacji przeglądowej niniejszego cyklu doktorskiego. We wspomnianej pracy Doktorant bardzo dokładnie opisał wpływ właściwości powierzchniowych na biokompatybilność polimerów/biopolimerów oraz możliwości ich modyfikacji w kontekście zastosowań biomedycznych.

W ramach pracy eksperymentalnej, mgr Kacper Przykaza przeprowadził liczne badania dotyczące fizykochemicznej modyfikacji PEEK oraz oceny biokompatybilności otrzymanych materiałów i wieloskładnikowych filmów pokrywających PEEK.

Doktorant przeprowadził badania właściwości fizykochemicznych PEEK przed i po aktywacji plazmą powietrzną, scharakteryzował filmy substancji bioaktywnych naniesionych na podłoże stałe (w tym filmy naniesione na powierzchnie stałe metodą rozplływania i zanurzania w roztworze). Magister Kacper Przykaza przeprowadził również badania procesu mineralizacji na wybranych powierzchniach PEEKp i PEEKp/bioszkoło w sztucznym płynie ustrojowym, dokonał oceny biokompatybilności na podstawie zachowania wobec modelowych błon biologicznych, scharakteryzował filmy dwuskładnikowe typu substancja bioaktywna/fosfolipid DPPC lub cholesterol oraz filmów trójskładnikowych typu substancja bioaktywna/fosfolipid DPPC-cholesterol (DPPC-Chol), scharakteryzował oddziaływania substancji bioaktywnych i błonotwórczych ze składnikami subfazy ciekłej, przeprowadził badania fizykochemiczne powierzchni PEEK z naniesionymi filmami substancji bioaktywnych (w tym scharakteryzował filmy jedno- i dwuskładnikowe naniesionych na powierzchnie PEEK metodą LB oraz filmy trójskładnikowe naniesione na powierzchnie PEEK metodą LB, wykonał badania procesu uwalniania substancji leczniczej z powierzchni PEEK modyfikowanej filmami). Doktorant dokonał szczegółowej charakterystyki monowarstw substancji biologicznie aktywnych na granicy faz ciecz/gaz. Dokonał wieloetapowej charakterystyki zmian zwilżalności powierzchni polimeru przed i po naniesieniu filmów, swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych, topografii oraz składu chemicznego modyfikowanego PEEK w aspekcie oceny jego biokompatybilności, przebiegu procesu osteointegracji i możliwości uwalniania substancji leczniczej (CsA lub NAP) z jego powierzchni.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów na granicy faz ciecz/gaz Doktorant stwierdził, że (1) obecność CsA w warstwie Chol, DPPC i DPPC-Chol osadzonej na granicy



faz ciecż/gaz powoduje w każdym przypadku przesunięcie izoterm $\pi-A$ w kierunku większych powierzchni przypadających na cząsteczkę w monowarstwie, a efekt ten pogłębia się wraz ze wzrostem ilości CsA w filmie, (2) CsA przyczynia się do znacznego wzrostu elastyczności monowarstw DPPC, Chol oraz DPPC-Chol, (3), monowarstwy zawierające CsA znajdują się w stanie ciekłym rozprężonym lub pośrednim LE-LC (faza ciekła rozprężona monowarstwy - faza ciekła skondensowana monowarstwy), co koreluje z płynnością rzeczywistych błon biologicznych, (4) obecność CsA w monowarstwach DPPC i Chol generuje powstawanie struktur domenowych, których ilość i wielkość zależy od zawartości CsA w filmie, (5) w monowarstwach dwuskładnikowych DPPC-CsA i Chol-CsA obserwuje się wzrost oddziaływań odpychających między cząsteczkami w odniesieniu do filmów jednoskładnikowych, a filmy trójskładnikowe DPPC-Chol-CsA charakteryzują się zwiększonym udziałem oddziaływań przyciągających, (6) obecność Chit w subfazie wpływa na obniżenie stopnia upakowania monowarstw DPPC-NAP i zwiększenie elastyczności, (7) Chit wpływa na grubość badanych monowarstw i orientację cząsteczek poszczególnych składników.

Z kolei na podstawie przeprowadzonych eksperymentów na powierzchni stałej PEEK mgr Kacper Przykaza stwierdził, że (1) aktywacja powierzchni PEEK plazmą powietrzną wywołuje wzrost jej mikrochropowatości i swobodnej energii powierzchniowej, ułatwiając tym samym adhezję substancji biologicznie aktywnych i tworzenie stabilnych filmów, (2) w zależności od zastosowanej techniki osadzania substancji biologicznie aktywnych (zanurzania, rozpylania lub LB) otrzymuje się powierzchnie o innych właściwościach zwilżania i parametrach energetycznych, (3) dla filmów Chit optymalną jest technika zanurzania w roztworze, natomiast dla DPPC, Chol i CsA technika LB gwarantującą uzyskanie warstw o właściwym składzie i organizacji, (4) w zależności od składu filmu osadzonego na powierzchni PEEK, a także dzięki obecności Chit możliwa jest kontrola zwilżalności powierzchni oraz wartości swobodnej energii powierzchniowej, (5) obecność Chit przyczynia się do otrzymania powierzchni bardziej hydrofilowych o większych wartościach swobodnej energii powierzchniowej, bez względu na zastosowaną technikę nanoszenia filmów zawierających DPPC, Chol i CsA (rozpylania lub LB), (6) istnieje korelacja zmian zwilżalności powierzchni z właściwościami fizykochemicznymi filmów otrzymanych na granicy faz ciecż/gaz (stanem fizycznym, rodzajem i siłą oddziaływań międzycząsteczkowych, grubością warstw, tworzeniem struktur domenowych), (7) wykorzystując technikę spektrometrii mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (TOF-SIMS) możliwa jest analiza składu chemicznego otrzymanych powierzchni, a także struktury wieloskładnikowych filmów zawierających CsA, ściśle zależnych od stężenia poszczególnych składników oraz obecności Chit, (8) pod wpływem kontaktu z wodą zachodzi uwalnianie CsA z trójskładnikowych filmów DPPC-Chol-CsA zaadsorbowanych na powierzchni PEEK, a obecność Chit poprawia stabilność filmu podczas tego procesu, co pośrednio wspomaga proces kontrolowanego

M. Sobn

uwalniania substancji leczniczej, (8) Chit może adsorbować się na powierzchni PEEK razem z bioszklą i na jego cząstkach tworzyć spoiwo immobilizujące bioszklę, prowadząc do uzyskania biokompatybilnego, przeciwbakteryjnego pokrycia dodatkowo indukującego proces osteointegracji implantu z kością, (9) otrzymane powierzchnie zawierające Chit i bioszklę mają odpowiednią zwilżalność, optymalną w aspekcie biokompatybilności zależnie od zawartości Chit w warstwie, (10) powierzchnie PEEK z naniesioną warstwą bioszki wykazują aktywność w procesie tworzenia struktur hydroksyapatytowych podczas inkubacji w sztucznym płynie ustrojowym (SBF), a obecność Chit dodatkowo wpływa korzystnie na przebieg tego procesu.

Podsumowując wyniki swoich badań Doktorant słusznie stwierdził, że zwilżalność powierzchni PEEK jest ściśle związana ze składem oraz rodzajem naniesionych filmów. Ponadto zaobserwował silny efekt obecności Chit i bioszki, który wprowadził dodatkowe i bardzo pożądane funkcje powierzchniowe (większą hydrofilowość, możliwość uwalniania CsA z powierzchni, poprawę biokompatybilności w kontakcie z SBF).

W ocenie recenzenta przedstawione w dysertacji wyniki badań dotyczące właściwości filmów osadzonych na granicy faz ciecz/gaz oraz na nośniku stałym PEEK poszerzają wiedzę na temat oddziaływań zachodzących w układach tego typu oraz ich wpływie na biokompatybilność materiałów. W pełni uzasadniona jest konieczność kontynuowania wspomnianych badań podstawowych i aplikacyjnych (również biologicznych *in vitro* oraz *in vivo*). Uzyskane wyniki badań są bardzo perspektywiczne i niezwykle cenne w aspekcie projektowania nowoczesnych systemów dostarczania substancji leczniczych i innowacyjnych biomateriałów implantacyjnych.

Oceniając część eksperymentalną dysertacji stwierdzam, że Doktorant wykazał się umiejętnością prowadzenia prac badawczych oraz krytycznej i dojrzałej dyskusji naukowej. Magister Kacper Przykaza opracował metody otrzymywania innowacyjnych biomateriałów oraz przeprowadził dużą liczbę badań fizykochemicznych, analitycznych i strukturalnych, co jest dowodem Jego wysokich kwalifikacji i dużego doświadczenia. Wszystkie dane eksperymentalne zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny, a wyniki logicznie skomentowane w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. Autor dokonał prawidłowej interpretacji dużej liczby danych eksperymentalnych, co świadczy o Jego biegłej znajomości zastosowanych metod i technik badawczych.

W ostatniej części dysertacji, Doktorant na podstawie krytycznej dyskusji sformułował spójne, wyważone i logiczne wnioski.

Największym osiągnięciem mgr. Kacpra Przykazy w ocenie recenzenta jest opracowanie metod otrzymywania wieloskładnikowych i wielowarstwowych filmów na powierzchni PEEK oparte na Chit, DPPC i Chol, z których uwalnia się CsA. Ponadto



na uwagę zasługuje opracowanie metody otrzymywania filmu Chit/bioszkle na powierzchni PEEK wykazującego znaczną biokompatybilność po inkubacji w SBF.

Prosiłbym Doktoranta o informację dotyczącą następujących kwestii:

- 1) Czy przeprowadzono badania stabilności oraz kinetyki uwalniania CsA i NAP z otrzymanych układów? W ocenie recenzenta jest to bardzo istotna informacja.
- 2) Czy przeprowadzono wstępne badania cyto- lub/i genotoksyczności powierzchniowo immobilizowanych biomateriałów?

Reasumując, dysertacja została zredagowana w sposób bardzo staranny. Pracę czyta się dobrze. Układ treści jest logiczny i spójny. Zakres pracy doktorskiej jest bardzo obszerny. Warto podkreślić fakt opublikowania przez Doktoranta wyników swoich badań w formie aż dziewięciu artykułów oraz studium literaturowego w formie artykułu przeglądowego. Niewątpliwie, jest to duże osiągnięcie Doktoranta. Magister Kacper Przykaza jest pierwszym autorem ośmiu publikacji wchodzących w skład cyklu. We wszystkich pracach widoczny jest udział Doktoranta w koncepcji, koordynacji badań oraz przygotowaniu manuskryptu. Świadczy to o wiodącej roli mgr. Kacpra Przykazy w publikacjach wchodzących w skład cyklu. Jestem również pod ogromnym wrażeniem tak dużego dorobku naukowego Doktoranta, rzadko spotykanego na tym etapie kariery akademickiej.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr. Kacpra Przykazy jest bardzo wartościowym, oryginalnym i interdyscyplinarnym opracowaniem naukowym. Uważam, że uzyskane wyniki badań wzbogacają wiedzę w dyscyplinie nauki chemiczne. Doktorant wykazał się umiejętnością planowania i wykonywania eksperymentów, interpretowania i krytycznej dyskusji wyników badań oraz formułowania logicznych wniosków.

Reasumując z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr. Kacpra Przykazy pt. *"Charakterystyka fizykochemiczna i ocena biokompatybilności filmów wybranych substancji bioaktywnych osadzonych na powierzchni PEEK lub PEEK/bioszkle"* z nadmiarem spełnia wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). W związku z tym, wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Nauk Chemicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o nadanie mgr. Kacprowi Przykazy stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.



Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy, wartościowy materiał badawczy, wyjątkowe walory poznawcze i aplikacyjny charakter pracy oraz opublikowanie uzyskanych wyników badań w uznanych czasopismach naukowych, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Kacpra Przykazy.

A handwritten signature in blue ink, reading "Marek Sobca". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.