

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Klaudii TREMBECKIEJ-WÓJCIGI
pt.: „Biomimetyczne powłoki na bazie węgla aktywujące komórki macierzyste z krwi
w warunkach dynamicznych”
zrealizowanej pod kierunkiem promotora dr. hab. inż. Romana Majora

Recenzja rozprawy doktorskiej została opracowana na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z dnia 23.03.2017 roku oraz zlecenia Dyrektora Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN prof. dr. hab. inż. Pawła Zięby (pismo IMIM/DP/915/2017).

1. Charakterystyka ogólna pracy

Powodzenie zabiegów z udziałem biomateriałów oddziaływujących bezpośrednio z przepływającą krwią uzależnione jest od wielu czynników, do których zaliczyć należy postać konstrukcyjną implantu oraz właściwości fizyczne i chemiczne jego powierzchni, gwarantujące wymaganą hemokompatybilność w środowisku tkanek układu krwionośnego.

Jedną z najważniejszych cech powierzchni implantów powinna być wysoka atrombogenność, dzięki której ograniczona jest odpowiedź komórkową na jego obecność. Ogranicza ona prawdopodobieństwo powstania skrzepu, którego pierwszymi etapami jest adsorpcja białek osocza do powierzchni oraz aktywacja procesów krzepnięcia krwi i adhezji elementów morfotycznych. Oczywiście proces ten warunkowany jest również właściwościami układu krążenia i krwi: mechanicznymi, elektrycznymi i magnetycznymi.

Najczęstszym sposobem zapobiegania powstawaniu skrzepów jest podawanie środków przeciwzakrzepowych, co powoduje ryzyko krwotoku, w następstwie nawet małego urazu. Stąd też prowadzone są badania mające na celu modyfikację powierzchni implantów lub wytworzenia warstw wierzchnich w celu zapobieganiu temu niebezpiecznemu procesowi. Jednym z bardzo obiecujących kierunków badań jest wytwarzanie biomimetycznych powłok. Efektem tego procesu jest modyfikacja topografii powierzchni celem wytworzenia nisz komórkowych. Dzięki temu możliwe jest zapewnienie korzystnego środowiska do wzrostu, pro-

liferacji i różnicowania komórek macierzystych. Najkorzystniejszym w układzie krwionosnym kierunkiem różnicowania komórek macierzystych, kontaktujących się z biomateriałem, jest śródbłonek. Śródbłonek w kontakcie z krwią wykazuje małe powinowactwo do białek osocza, a nawet zaadsorbowane nie pobudzają kaskady krzepnięcia krwi. Ponadto jest źródłem substancji przeciwdziałających krzepnięciu krwi: heparyny, prostacykliny, tlenku azotu, trombomoduliny.

Doktorantka w swojej pracy porusza tematykę wpływu biomimetycznych powłok na bazie węgla na różnicowanie komórek macierzystych w kierunku śródbłonka, analizując jednocześnie wpływ parametrów wytwarzania fałdowanych powłok na ich właściwości fizyczne oraz kontakt w krwią.

Problematykę recenzowanej pracy uważam za aktualną i uzasadnioną oraz dobrze ukierunkowaną, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i utylitarnym. Wymagała ona przeprowadzania badań z zakresu inżynierii biomateriałów, inżynierii powierzchni oraz oceny biologicznej proponowanych rozwiązań.

Rozprawa doktorska ma tradycyjny układ i składa się części literaturowej (str. 7-58) oraz części doświadczalnej (str. 59-168). Spis literatury obejmuje 314 pozycji. Zaprezentowany przegląd piśmiennictwa jest bardzo obszerny i został opracowany na podstawie pozycji literaturowych w większości obejmujących ostatnie dziesięciolecie. Świadczy to o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do podjęcia problematyki badawczej. Pracę uzupełnia aneks zawierający protokoły nanoszenia powłok, wykaz oznaczeń i skrótów, spis rysunków (100 pozycji) i tabel (18 pozycji) oraz podziękowania. Praca została zrealizowana w ramach projektu 2014/13/B/ST8/04287 2014-2016; pt. „Inspirowane biologicznie materiały cienko-warstwowe o kontrolowanym udziale naprężeń własnych w aspekcie odtwarzania mikrośrodowiska dla komórek macierzystych”, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz przy współpracy z Joanneum Materials Research, Laser And Plazma Processing z Leoben w Austrii.

2. Ocena części literaturowej rozprawy

Część literaturowa podzielona jest na sześć podrozdziałów. W pierwszym stanowiącym „Wprowadzenie” przedstawiono podstawowe informacje na temat biomateriałów stosowanych w medycynie i dokonano ich podziału oraz charakterystyki. W drugim podrozdziale (3.1) Doktorantka charakteryzuje komórki macierzyste, opisuje ich klasyfikację oraz właściwości, szczególny nacisk kładąc na komórki progenitorowe śródbłonka oraz indukowane komórki śródbłonka. Bardzo obszerny podrozdział trzeci (3.2) poświęcony jest opisowi nisz komórkowych, ich strukturze fizycznej oraz czynnikom regulującym funkcje życiowe komórek macierzystych w obrębie niszy. Zagadnienia te analizowano na przykładzie macierzystych komórek hematopoetycznych. Ponadto omówiono wpływ właściwości modeli materiałowych nisz komórkowych, w szczególności podłoża, na różnicowanie komórek. Szczegółowe omó-

wienie wpływu parametrów podłoża na ukierunkowane różnicowanie komórek stanowił treść czwartego podrozdziału (3.3). Przedstawiono w nim wpływ topografii powierzchni oraz sztywności podłoża na omawiane zagadnienie, analizując ponadto wpływ naprężeń ścinających wywołanych czynnikami hydrodynamicznymi na różnicowanie komórek. W kolejnym podrozdziale Autorka (3.4) omawia zagadnienia fałdowania powierzchni cienkowarstwowych oraz teoretycznego opisu ich parametrów. Końcowy podrozdział (3.5) stanowi opis procesu wykrzepiania krwi w kontakcie z biomateriałem oraz testu mutagenności biomateriałów.

Część literaturową rozprawy oceniam pozytywnie. Stanowi ona wystarczającą podstawę teoretyczną do opracowania podjętego tematu rozprawy. Jednocześnie uważam, że proporcje pomiędzy szeroko rozumianymi zagadnieniami biologicznymi a materiałowymi są nieco zachwiane. Ponieważ oceniana praca należy do zakresu nauk technicznych oczekiwałbym szerszego omówienia metod modyfikacji powierzchni biomateriałów i wpływu na ich właściwości.

3. Ocena części merytorycznej rozprawy

W rozdziale czwartym doktorantka formułuje założenia pracy oraz tezę w brzmieniu:

„Procesy inżynierii materiałowej, poprzez sterowanie mikrostrukturą i topografią powierzchni umożliwiają odtworzenie funkcji nisz komórkowych, co pozwala na wychwyty i aktywizację komórek macierzystych z przepływającej krwi.”

Część badawcza pracy podzielona jest na trzy rozdziały.

Pierwszy z nich (rozdział 5) poświęcony jest opisowi materiałów stosowanych w pracy oraz metodyce badawczej, wykorzystywanej w celu udowodnienia postawionej tezy. Materiał badawczy stanowiły powłoki na bazie węgla amorficznego i węgla diamentopodobnego nanoszone technikami fizycznego osadzania z fazy gazowej na różne podłoża, w tym poddane wstępnemu odkształceniu. Interdyscyplinarny charakter pracy wymagał zastosowania wielu nowoczesnych metod badawczych m.in. z zakresu inżynierii biomateriałów i powierzchni, a także oceny biologicznej wytworzonych powłok.

Wyniki eksperymentów przedstawiono w rozdziale 6, podzielonym na cztery podrozdziały. Podrozdział pierwszy (6.1) zawiera wyniki badań powłok, wytworzonych na płaskim podłożu, przeznaczonych do kontaktu z krwią w warunkach działania dużych sił ścinających. Określono własności fizyczne cienkich powłok amorficznego węgla (a-C:H) oraz diamentopodobnych, dotowanych krzemem (Si-DLC), o zróżnicowanej grubości, wytworzonych na krzemie. Badania obejmowały pomiary: nanotwardości, modułu sprężystości, adhezji oraz zwilżalności powłok. Na podkreślenie zasługuje bardzo dokładnie przeprowadzona przez Doktorantkę ilościowa analiza oddziaływania krwi z powłokami, przeprowadzona na podstawie badań wpływu naprężeń ścinających na proces wymywania komórek zadherowanych do powierzchni. Obejmowała ona między innymi wyznaczenie wartości naprężeń krytycznych (dla których prawdopodobieństwo oderwania lub pozostania komórki na podłożu jest równe)

oraz szybkości spontanicznego odrywania się komórek (przy braku naprężeń ścinających). Następnie dla dwóch rodzajach powłok przeprowadzono próbę funkcjonalizacji powierzchni, metodą laserowej litografii interferencyjnej w celu rekonstrukcji funkcji nisz komórkowych. Jednakże badania z udziałem komórek progenitorowych wykazały słaby stopień ich różnicowania w kierunku śródbłónka. Po analizie treści rozprawy uważam, że podrozdział ten, będący wstępnym (jak to określono w pracy), jest luźno związany przewodnią tematyką pracy. Stąd też sugestia o jego nieumieszczenie go w opracowaniu książkowym.

Treść dwóch kolejnych podrozdziałów (6.2., 6.3.) stanowią wyniki badań cienkich fałdowanych powłok osadzonych na podłożu poliuretanu PU oraz polieteroeteroketonu PEEK z wykorzystaniem wysokoenergetycznych metod fizycznego osadzania z fazy gazowej. Celem fałdowania powłok było topograficzne odtworzenie właściwości nisz komórkowych. W podrozdziale 6.2. badano powłoki diamentopodobne (DLC) oraz powłoki amorficznego węgla (a-C:H) o zróżnicowanych grubościach oraz powłokę amorficznego węgla domieszkowaną azotem (a-C:N). Określono topografię, mikrostrukturę, własności tribologiczne, twardość, moduł Younga oraz zwilżalność powłok. Szczególnie interesujące są wyniki badań topografii powłoki prowadzone dla wielkości obszarów odpowiadających polu powierzchni przylegania pojedynczej komórki oraz fragmentu monowarstwy komórek. Jak również wyniki badań mikrostruktury wykazujące występowanie fałd w skali nanometrycznej, umożliwiające ponadto oszacowanie maksymalnej wartości naprężeń własnych, powstałych w wyniku odkształcenia, nie powodujących powstawania pęknięć. Zdaniem recenzenta omawiany fragment pracy powinien zostać rozszerzony o wyniki badań właściwości powierzchni podłoża. W podrozdziale tym przedstawiono również bardzo obszerne wyniki badań biologicznych obejmujące testy umożliwiające ocenę biokompatybilności powłok. Obejmowały one badania cytotoksyczności, adhezji, proliferacji, efektywności formowania monowarstwy komórkowej (endotelializacji). Badania przeprowadzono w wykorzystaniu komórek śródbłónka. Ponadto określano hemozgodność oraz adsorpcję białka z krwi. Analiza wyników badań umożliwiła określenie nie tylko wpływu powłok lecz również parametrów osadzania na ich biokompatybilność.

Wnioski wynikające z powyższego podrozdziału pracy wykorzystano do wytypowania powłok do badań, wyniki których przedstawiono w podrozdziale 6.3. Badano trzy fałdowane powłoki, dwie amorficznego węgla (a-C:H) o jednakowym składzie chemicznym i grubości, jednakże naniesione przy różnych parametrach procesu oraz amorficznego węgla domieszkowanym azotem (a-C:N) naniesione na podłoża poliuretanowe. Przeprowadzono, z wykorzystaniem testów dynamicznych, analizę oddziaływania krew-materiał dla powłok oraz powłok z komórkami indukowanymi (iCells), gdzie analizie podlegała powierzchnia powłok oraz krew pobrana z próbek. Ponadto wykonano badania wpływu powłoki na różnicowanie komórek progenitorowych w kierunku śródbłónka. Na podstawie analizy wyników badań Doktorantka wybrała do badań genotoksyczności, w odniesieniu do aktywacji układu krzepnięcia, powłokę cechującą się najlepszą hemozgodnością - powłokę amorficznego węgla (a-

C:H) o grubości 100 nm. Wyniki badań wykazały brak cech mutagennych powłoki. W tym miejscu nasuwa się pytanie: jakie właściwości powłok amorficznego węgla (a-C:H) o grubości 100 nm uzyskanych przy zróżnicowanych parametrach osadzania decydują o zróżnicowanych wynikach analiz oddziaływania krew-materiał i badań komórkowych?

W ostatnim podrozdziale 6.4. przedstawiono wyniki badań powłok fałdowanych powstałych na odkształconym podłożu poliuretanowym. Analizie poddano wpływ grubości powłok na amplitudę fal przy stałych wartościach wstępnego odkształcenia podłoża. Wykorzystując wyniki badań mikrostruktury oraz równanie Stoney'a oszacowano wielkość naprężeń własnych w warstwie. Porównując wyniki naprężeń własnych nieodkształconych powłok z podrozdziału 6.2, (str. 96: amorficzny węgiel a-C:H - 2,79 GPa oraz diamentopodobny węgiel domieszkowanych krzemem Si-DLC 6,83 GPa) z wynikami naprężeń powłoki nieodkształconej z podrozdziału 6.4, (str. 150, 241,31 GPa) nasuwa się pytanie o przyczynę tak dużych różnic wartości naprężeń. Podrozdział uzupełniają wyniki badań topografii powierzchni oraz różnicowania komórek progenitorowych w kierunku śródbłonka na powierzchni fałdowanych powłok. Zaobserwowano korzystny wpływ wstępnego odkształcenia podłoża na proces różnicowania komórek macierzystych progenitorowych w kierunku śródbłonka. Jednakże przekroczenie wartości odkształcenia wynoszącej 5% skutkuje osłabieniem różnicowania komórek.

Pracę kończy rozdział siódmy obejmujący podsumowanie wyników badań oraz wnioski wynikające z ich analiz.

Do głównych osiągnięć Doktorantki zaliczam:

- opracowanie innowacyjnych koncepcji modyfikowania powierzchni biomateriałów do kontaktu z krwią, przez fałdowanie cienkich powłok, zapewniających dużą hemozgodność oraz poprzez ich topografię rekonstrukcję funkcji nisz komórkowych wpływającą na różnicowanie komórek macierzystych progenitorowych w kierunku śródbłonka,
- opracowanie programu i przeprowadzenie interdyscyplinarnych badań umożliwiających określenie korelacji pomiędzy strukturą, własnościami fizycznymi, hemokompatybilnością powłok a ich stopniem różnicowania komórek macierzystych w kierunku śródbłonka,
- określenie wpływu wielkości odkształceń wstępnych podłoża na zdolność wytworzonych, technikami fizycznego osadzania z fazy gazowej, powłok węglowych do różnicowania komórek oraz efektywność formowania na ich powierzchni monowarstwy śródbłonka.

4. Zagadnienia polemiczne i uwagi

Uwagi posiadające w większości charakter dyskusyjny przedstawione zostały w częściach poświęconych ocenie części literaturowej i merytorycznej rozprawy. Uwagi edycyjne oraz drobne nieścisłości zostały doktorantce przekazane podczas osobistej dyskusji.

5. Ocena końcowa

Recenzowaną pracą oceniam pozytywnie. Na podstawie analizy uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań oraz wniosków z niej wypływających uważam, że cel pracy został osiągnięty, a teza wystarczająco udowodniona. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania badań, doboru i stosowania nowoczesnych, obejmujących wiele dyscyplin metod badawczych oraz analizy wyników badań i wniosków z nich wynikających.

Wniosek końcowy

Na podstawie analizy rozprawy doktorskiej mgr inż. Klaudii TREMBECKIEJ-WÓJCIGI pt. „*Biomimetyczne powłoki na bazie węgla aktywujące komórki macierzyste z krwi w warunkach dynamicznych*” stwierdzam, że zawiera ona wartościowe wyniki poznawcze wnoszące wkład do inżynierii materiałowej, a w szczególności inżynierii biomateriałów. Ocenianą pracę cechuje oryginalna tematyka, a udowodnienie postawionej tezy wymagało zastosowania nowoczesnych metod badawczych. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktorantki do rozwiązywania problemów z zakresu inżynierii materiałowej, a w szczególności inżynierii biomateriałów.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r. (Dz. U. poz. 595 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN o dopuszczenie mgr inż. Klaudii TREMBECKIEJ-WÓJCIGI do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

W przypadku pozytywnego przebiegu obrony pracy, Recenzent stawia wniosek o rozpatrzenie wyróżnienia pracy doktorskiej, uzasadniając swoją propozycję kompleksowym podejściem do bardzo aktualnej problematyki obejmującej szerokie spektrum badawcze.



Zabrze, 08.06.2017 r.