



Dr hab. inż. Agnieszka Sobczak-Kupiec

Kraków, dn. 21.01.2016 r.

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

Politechnika Krakowska

asobczak@chemia.pk.edu.pl

tel. 12 628 21 76 fax: 12 628 20 36

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Jelonek

Pt. „Implant kostny o charakterze nośnika leków – projektowanie, synteza oraz wybrane właściwości”

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Jelonek przygotowana pod opieką promotorską Pani Profesor dr hab. Barbary Oleksyn oraz dr Agnieszki Skórskiej-Stania, przedstawia wyniki badań nad projektowaniem, otrzymaniem oraz charakterystyką wybranych właściwości materiału kośćcozastępczego o charakterze nośnika leku. Temat badawczy jest aktualny, ważny i ciekawy, tak w kontekście badań czysto poznawczych jak i możliwych potencjalnych zastosowań opracowanych układów.

Badania nad implantami o charakterze nośników leków należą do tych nurtów badawczych, które integrują wysiłki badaczy wielu dyscyplin naukowych, poczynając od inżynierii materiałowej, poprzez farmację, chemię i technologię chemiczną aż po mechanikę, biologię i medycynę. Znaczącym postępom w rozwoju nowych materiałów przeznaczonych na implanty towarzyszą coraz większe oczekiwania dotyczące tak poprawy ich biofunkcjonalności, biogodności oraz nadania im specyficznych cech użytkowych. W swojej pracy Doktorantka zmierzyła się z większością tych oczekiwań projektując i wykonując materiał przeznaczony na implant oraz badając możliwość jego wykorzystania jako nośnika substancji aktywnej.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Jelonek została przygotowana, w układzie standardowym, typowym dla prac doktorskich. Po krótkim wprowadzeniu znajduje się część przedstawiająca stan wiedzy w przedmiocie badań, po której następuje prezentacja celu i zakresu badań, opis materiałów i metod badawczych, prezentacja

i analiza uzyskanych wyników, a także rozdział zawierający podsumowanie i wnioski. Pracę Autorka uzupełnia streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem stosowanych w pracy symboli, a także informacją dotyczącą swojego dorobku naukowego i bibliografią.

Udokumentowany dorobek mgr Agnieszki Jelonek z zakresu związanego z dysertacją to dwa artykuły w czasopiśmie Inżynieria Biomateriałów z 2010 i 2013 r. Praktyczny wymiar prac badawczych został potwierdzony współautorstwem zgłoszenia patentowego z 2014 r.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska liczy 155 stron i podzielona jest na pięć głównych części obejmujących: przegląd stanu wiedzy i techniki (54 strony), założenia i cel pracy (2 strony), badania własne z analizą wyników (71 stron), wnioski końcowe (2 strony) oraz spis cytowanej literatury (12 stron). Pozostałe części rozprawy doktorskiej obejmują: wprowadzenie, spis treści, wykaz skrótów i oznaczeń próbek. Część eksperymentalna wraz z wnioskami i analizą uzyskanych rezultatów stanowi 47,1 % objętości pracy. Spis cytowanej literatury obejmuje 117 pozycji.

Przegląd stanu wiedzy i techniki w przedmiocie zagadnienia rozprawy (rozdział 1) obejmuje opis tkanki kostnej, z uwzględnieniem jej hierarchicznej struktury. Rozdział 2 poświęcony jest biomateriałom do uzupełnień ubytków kostnych pochodzenia naturalnego i syntetycznego. W rozdziale nr 3 szeroko zostały omówione fosforany (V) wapnia najistotniejsze z punktu zastosowań medycznych, w tym hydroksyapatyt, fosforan (V) wapnia – TCP oraz dwufazowe tworzywo ceramiczne BCP. Ponadto w rozdziale zamieszczono szeroki opis wpływu porowatości na wytrzymałość implantów kostnych oraz implantów kostnych w postaci granulek. Rozdział nr 4 poświęcony jest charakterystyce, polimerów biomedycznych – polilaktydów, w tym syntezy, degradacji oraz odpowiedzi tkankowej na te materiały. Przegląd literaturowy kończy się zwięzłym opisem materiałów kompozytowych oraz polimerowych nośników leków stosowanych przy zakażeniach kości. W podsumowaniu istniejącego stanu techniki Doktorantka wskazuje na potrzebę opracowania materiału przeznaczonego na implant kostny o charakterze nośnika leku, który będzie spełniał szczególne wymagania związane z aplikacją

biomateriałów kośćcozastępczych. Uważam, że przedstawiona w pierwszej części rozprawy analiza stanu techniki stanowiła dobrą podstawę do rozpoczęcia badań. Mimo nielicznych skrótów myślowych przyjętych przez autorkę można stwierdzić, że wywiązała się z tego zadania z powodzeniem; W pracy znalazły się błędne i nieprecyzyjne sformułowania np. stwierdzenia: str. 46 „zawiesina proszku hydroksyapatytowego w chitozanie”, str. 47 brak wyjaśnienia co to jest CERASPESE 5468CF i HASANTIFOAMER 551, str. 48 „grupy boczne przyłączone są do cząsteczki słabszymi wiązaniami”, str. 67 „spektrometria w podczerwieni FTIR itp..

Podjęty przez Doktorantkę problem badawczy jest trafny z uwagi na jego znaczenie poznawcze i praktyczne, posiada elementy oryginalne. Przyjęta w pracy teza naukowa zakłada możliwość opracowania nowej wielofunkcyjnej struktury kompozytowej o charakterze nośnika leku.

Ocena merytoryczna

Przedstawiona praca doktorska mgr Agnieszki Jelonek miała na celu zaprojektowanie i otrzymanie materiału kośćcozastępczego o charakterze nośnika leku. W ramach pracy Doktorantka wytypowała warunki syntezy oraz scharakteryzowała otrzymane fosforany wapnia stosując m.in. analizę rentgenograficzną i spektrofotometrię w podczerwieni. Doktorantka scharakteryzowała również zastosowany w badaniach poli(D,L-laktyd), określając jego temperaturę zeszklenia i kąt zwilżania. Autorka dopracowała metodę wytwarzania porowatych mikrogranul z HAp oraz BCP, oceniła ich morfologię oraz porowatość. W kolejnym etapie badań Doktorantka opracowała sposób pokrywania otrzymanych granul warstwą poli(D,L-laktydu) i przeprowadziła ocenę jakości pokrycia polimerowego oraz badania degradacji w warunkach *in vitro* – w buforze fosforanowym PBS.

W kolejnym etapie badań mgr Jelonek opracowała sposób pokrywania granul fosforanowych poli(D,L-laktydem) z zawartością modelowego leku – kindamycyny. Zbadła aktywność uwolnionej z nośnika kindamycyny w stosunku do bakterii *Staphylococcus aureus*, które są wrażliwe na ten lek. W ramach pracy zrealizowana została weryfikacja uzyskanych materiałów w warunkach *in vivo*, na zwierzętach laboratoryjnych.

Wyniki badań stanowią dosyć obszerny materiał o charakterze aplikacyjnym i dobrze korelują z założonym celem i koncepcją pracy. Autorka nie tłumaczy szeregu opisywanych zjawisk na poziomie molekularnym lub strukturalnym, nie wyciąga też wniosków o charakterze podstawowym, natomiast w sposób rzetelny analizuje i opisuje właściwości wytworzonych przez siebie materiałów. Powyższe stwierdzenie w żaden sposób nie obniża wartości pracy doktorskiej, wręcz przeciwnie, wskazuje na charakter badań stosowanych i opracowanie nowatorskich rozwiązań, które mogą zostać wdrożone do praktyki klinicznej i należy ocenić to pozytywnie.

Doktorantka pomimo dużej staranności nie uniknęła w swojej pracy merytorycznych mankamentów wymagających zwrócenia uwagi recenzenta, które jednak mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają wartości naukowej dysertacji, a mianowicie:

1. W opinii recenzenta doktorantka myli dwa pojęcia osteokonduktywność oraz osteoinduktywność. Proszę o wyjaśnienie różnicy pomiędzy tymi określeniami.
2. Doktorantka m.in. na stronie 67 oraz 90 stwierdza, że „skład fazowy ceramicznych proszków został potwierdzony za pomocą metody FT-IR”. W opinii recenzenta metodą FT-IR nie można określić składu fazowego.
3. Na stronie 82 doktorantka stwierdziła, że intensywny niebieski odcień hydroksyapatytu spiekane go, związany jest z obecnością jonów manganu. Czy Doktorantka oznaczyła zawartość jonów manganu w materiale badawczym. Jaka zawartość tych jonów jest dopuszczalna ze względu na zastosowanie biomedyczne opracowanego materiału. Czy przeprowadzono analizy na zawartość np. metali ciężkich m.in. arsenu, rtęci ołowiu oraz kadmu, których maksymalne zawartości podają odpowiednie normy dla materiałów biomedycznych.
4. Na stronie 73 autorka stwierdza „dodatkowo aby sprawdzić szybkość degradacji poli(D,L-laktydu) co tydzień wykonywano pomiar zmiany masy próbek (począwszy od drugiego tygodnia inkubacji)”. Na jakiej podstawie Doktorantka stwierdza, że zmiana masy wiąże się wyłącznie z degradacją poli(D,L-laktydu). W roztworze buforu fosforanowego mogą następować procesy rozpuszczania i krystalizacji fosforanów wapniowych, które mogą również wpływać na zmianę masy kształtek badawczych. Do jakich produktów degraduje poli(D,L-laktyd), czy

przeprowadzono ich analizę np. metodą chromatografii żelowej GPC, czy badano roztwory inkubacyjne np. na zawartość wapnia, która byłaby bezpośrednio związana z rozpuszczaniem fosforanu wapniowego w PBS.

5. Na rysunku nr 25 str. 91 na widmie FT-IR proszku wyjściowego dla BCP niepoddanego obróbce termicznej i dalej w tabeli nr 8 str. 92, zaobserwować można pasma absorpcyjne przy liczbach falowych 961, 1637 i 1385 cm^{-1} , które Doktorantka przypisała drganiom związanym z obecnością grup CO_3^{2-} . Z drugiej strony podczas syntez zastosowano chłodnicę z filtrem KOH pochłaniającym ditlenek węgla. Czy w przypadku syntezy proszków hydroksyapatytowych również zaobserwowano analogiczne pasma absorpcyjne świadczące o obecności grup węglanowych przed kalcynacją (na rys. nr 24 przedstawiono widma tylko dla materiału kalcynowanego i spiekanego). Skąd mogą pochodzić grupy węglanowe w materiale, skoro w trakcie syntezy było zabezpieczenie przed pochłanianiem CO_2 z powietrza.
6. W opisanej na str. 83 syntezie proszku wyjściowego do otrzymania dwufazowego tworzywa bioceramicznego BCP Autorka sugeruje tworzenie się HAp z niedomiarem wapnia. Doktorantka stwierdza na podstawie badań XRD, że otrzymała proszek apatytowy z niedomiarem wapnia $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ (rys. 19), jednakże na widmie w podczerwieni dla tego materiału obecne są pasma absorpcyjne pochodzące od drgań grupy CO_3^{2-} (rys. 25), natomiast brak jest widocznych pasm absorpcyjnych związanych z obecnością grup HPO_4^{2-} . Należałoby się zastanowić, w jaki sposób następuje kompensacja różnicy ładunku w nowotworzonej się sieci krystalicznej HAp z niedomiarem wapnia. Niedobór dodatniego jonu wapnia musi pociągnąć za sobą zmianę składu w podsieci anionowej, gdyż inaczej generowałby się w kryształach nadmiar ujemnego ładunku elektrycznego, pochodzącego od trójwartościowego anionu PO_4^{3-} . Zachowanie elektroobojętności sieci mogłoby nastąpić poprzez zmniejszenie wartościowości jonu fosforanowego w wyniku protonizacji trójwartościowego jonu fosforanowego z wytworzeniem dwuwartościowego jonu HPO_4^{2-} : $\text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{HPO}_4^{2-}$. Jest to najczęściej opisywany w literaturze mechanizm towarzyszący krystalizacji niestechiometrycznego HAp w środowisku wodnym. Skutki takiego mechanizmu powinny być jednak widoczne w widmie IR; powinno się pojawić

pasma związane z drganiami grupy HPO_4^{2-} przy liczbie falowej ok 870 cm^{-1} . Brak tego pasma na rysunku 25 wydaje się nie sprzyjać opisanemu w literaturze mechanizmowi zmniejszenia stosunku molowego Ca/P. W przypadku opisanej syntezy można wziąć pod rozwagę czy w środowisku reakcji mogły być obecne jony węglanowe i należy dopuścić możliwość kompensacji różnicy ładunku poprzez wymianę trójwartościowego jonu fosforanowego na dwuwartościowy jon węglanowy.

7. Z aplikacyjnego punktu widzenia ważny jest stosunek wapnia do fosforu w bioceramice hydroksyapatytowej. Zgodnie z normami m.in. ISO 13779-3:2008 (E) Implant for surgery – Hydroxyapatite. part 3: Chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity, stosunek wapnia do fosforu powinien być zawarty w przedziale 1,65-1,82. W pracy zabrakło informacji na temat stosunku Ca/P dla otrzymanych materiałów.

Ocena końcowa

Podjęty w rozprawie problem badawczy jest w pełni trafny i oryginalny, ma znaczenie przede wszystkim praktyczne. Przyjęte przez Doktorantkę cele cząstkowe zostały zrealizowane w sposób poprawny, cel postawiony na wstępie został osiągnięty. Przyjęte metody badawcze oraz forma przedstawienia wyników badań były poprawne. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością wiedzy teoretycznej, metodologii badań oraz metod badawczych a także dobrym wykorzystaniem źródeł literaturowych. W podsumowaniu charakterystyki ogólnej pracy mgr Agnieszki Jelonek należy stwierdzić, iż mimo uwag recenzenta posiada ona niezbędne elementy wymagane w rozprawach doktorskich.

Reasumując, przedstawione wyżej uwagi i zapytania należy traktować raczej jako łatwe do usunięcia usterki, które nie obniżają wartości merytorycznej pracy.

Biorąc pod uwagę powyższą ocenę stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z kryteriami „Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnoszę o dopuszczenie mgr Agnieszki Jelonek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Sobuska-Kuypsta