

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła
Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów
Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

Kraków, 29 stycznia 2016

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. AGNIESZKI JELONEK

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

zrealizowanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Barbary Oleksyn

Recenzja rozprawy doktorskiej została opracowana na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z dnia 19.11.2015 roku oraz zlecenia Dyrektora Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN prof. dr. hab. inż. Pawła Zięby (pismo IMIM/DP/3112/2015).

Choroby i uszkodzenia kości stanowią poważny problem terapeutyczny i często wymagają zaopatrzenia chorego miejsca odpowiednimi biomateriałami, wspierającymi odbudowę uszkodzonej tkanki. Biomateriały takie, wprowadzane za pomocą traumatycznej procedury chirurgicznej, narażają dodatkowo pacjenta na rozwój infekcji w miejscu implantacji biomateriału. Dlatego w wielu ośrodkach na świecie trwają prace nad opracowaniem nowego typu biomateriałów, które z jednej strony mogłyby być wprowadzane do ubytków kostnych za pomocą metod małoinwazyjnych (np. iniekcji), a z drugiej strony pomagałyby zwalczać drobnoustroje chorobotwórcze i przeciwdziałać powstawaniu na nich biofilmu bakteryjnego.

Uwzględniając powyższe przesłanki Pani mgr inż. Agnieszka Jelonek w swojej pracy doktorskiej podjęła się opracowania ceramiczno-polimerowych kompozycji w postaci mikrogranulek wzbogaconych w lek przeciwbakteryjny a przeznaczonych do leczenia i odbudowy ubytków kostnych w obrębie twarzoczaszki. Takie podejście jest jak najbardziej uzasadnione, gdyż właśnie chirurgia szczękowo-twarzowa i chirurgia stomatologiczna

borykają się z problemami zarówno odbudowy tkanki kostnej jak i zachowania aseptyczności. Wiadome jest, że jama ustna i tkanki przyzębia są zasiedlone przez szereg szczepów bakteryjnych i zachowanie pełnej sterylności nie jest możliwe, stąd przy zabiegach chirurgicznych wskazana jest zawsze tzw. osłona antybiotykowa. Doktorantka prowadziła szeroko zakrojone badania nad otrzymywaniem mikrogranulek z hydroksyapatytu i dwufazowego tworzywa ceramicznego (BCP, tj. hydroksyapatyt – β -ortofosforan(V) wapnia), opracowała metodę ich modyfikacji za pomocą klindamycyny zawieszanej w degradowalnym poli(D,L-laktydzie) a w szczególności skupiła się na ocenie ich mikrostruktury, właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej.

Tematykę podjętą przez Autorkę uważam za potrzebną i perspektywiczną, gdyż mieści się ona w głównym nurcie badań dotyczących opracowania nowoczesnych wielofunkcyjnych materiałów do odbudowy tkanki kostnej, szczególnie w obrębie twarzoczaszki.

Praca liczy w sumie 155 stron i jest podzielona na wykaz skrótów, wstęp, część literaturową, cel i zakres pracy oraz część eksperymentalną. Pracę kończy stanowiący 117 pozycji spis bibliografii a także spis publikacji Autorki z zakresu pracy.

W pierwszej części na 52 stronach Doktorantka dokonała analizy literatury obejmującej zagadnienia związane z przedmiotem pracy. Po krótkim wprowadzeniu w rozdziale 1 opisała budowę i funkcje tkanki kostnej z uwzględnieniem jej budowy hierarchicznej oraz właściwości fizykochemicznych i mechanicznych. Analizując budowę anatomiczną układu kostnego człowieka skupiła się w szczególności na budowie czaszki, bo właśnie w takiej lokalizacji mają być zastosowane materiały będące przedmiotem pracy. Taki rozdział jest jak najbardziej na miejscu, gdyż dostarcza danych niezbędnych do zaprojektowania biomateriałów kościozastępczych, które powinny mieć budowę kompozytową i skład zbliżony do tkanki natywnej. Rozdział jest właściwie zredagowany, chociaż Doktorantka nie ustrzegła się w nim pewnej nieścisłości. W rozdziale tym na str. 14 Autorka napisała, że *„osteony są zorientowane wzdłuż kierunku działania największego obciążenia, zapewniając maksymalną siłę i sztywność kości”* a powinno być *„maksymalną wytrzymałość i sztywność kości”*. W rozdziale 2 Autorka opisała naturalne i syntetyczne biomateriały stosowane na implanty kostne, zaś w rozdziale 3 zaprezentowała najważniejsze informacje dotyczące fosforanów wapnia. Rozdział 3 jest obszerny (obejmuje w sumie 26 stron) i stanowi bardzo ciekawe kompendium wiedzy na temat hydroksyapatytu, β -TCP i dwufazowego tworzywa BCP, zawierające m.in. opis struktury tych materiałów, metod otrzymywania i przetwarzania w postać porowatych rusztowań oraz mikrogranulek. Następnie w rozdziale 4 Autorka omówiła polimery biomedyczne z grupy polilaktydów, zaś w rozdziale 5 ceramiczno-polimerowe biomateriały kompozytowe. Rozdział 6 traktuje

o polimerowych nośnikach leków, pokrótce prezentuje przyczyny rozwoju infekcji w układzie kostnym oraz opisuje najważniejsze właściwości klindamycyny – antybiotyku o szerokim spektrum działania. Z obowiązku recenzenta, chciałabym zwrócić uwagę na niefortunne sformułowanie zawarte w rozdziale 4.1.3 na str. 55, jakoby po wszczepieniu do organizmu implantów z polilaktydu wytwarzała się wokół nich torebka włóknista zawierająca oprócz fibroblastów, histiocyty, limfocytów również jednojądrzaste komórki olbrzymie. Nie spotkałam się jak dotąd z tymi ostatnimi komórkami – zapewne Autorka przejęzyczyła się, a chodziło jej albo o jednojądrzaste komórki fagocytyjające, czyli np. neutrofile, makrofagi albo wielojądrzaste komórki olbrzymie typu około ciała obcego, które zawsze można spotkać w okolicy wszczepów. Tak samo otoczka włóknista wokół implantu nie wytwarza się samoistnie, jak można by wnioskować z tego zdania, ale produkują ją komórki – fibroblasty – syntetyzując i wydzielając na zewnątrz kolagen i inne składniki substancji międzykomórkowej.

Pomimo tych uwag, z uznaniem muszę przyznać, że część literaturowa doktoratu została napisana bardzo dobrze. Stanowi jasny wywód, w którym Doktorantka ze swobodą porusza się w zagadnieniach dotyczących materiałów do leczenia ubytków tkanki kostnej. Może trochę brakuje w tej części informacji na temat już dostępnych na rynku wyrobów medycznych podobnego typu wzbogaconych w antybiotyki. Proszę więc, już w trakcie obrony doktoratu, o omówienie takich rozwiązań, np. membran, rusztowań, koralików, systemów wstrzykiwanych, będących nośnikami antybiotyków do lokalnego leczenia infekcji w układzie kostnym. Zdaniem moim jest to ważne zagadnienie, gdyż tematyka pracy doktorskiej dotyczy wielofunkcyjnych implantów kostnych, które oprócz funkcji podporowej mają również pełnić rolę nośników leków przeciwdziałających rozwojowi infekcji i każdy czytelnik z zainteresowaniem zapoznałby się z takimi danymi.

Podsumowując opinię na temat części literaturowej rozprawy chciałabym potwierdzić, że została ona przygotowana w sposób należyty, a na wymienione niewielkie niedociągnięcia, głównie natury nomenklaturowej, zwróciłam uwagę z obowiązku recenzenta, aby Doktorantka nie powieliała ich w przyszłości w kolejnych swoich pracach.

Następnie Autorka zdefiniowała cel i zakres pracy doktorskiej, który obejmował dwa etapy badań: (1) syntezę materiałów składowych, ich charakterystykę, sposób przetworzenia w postaci mikroporowatych granulek i określenie ich podatności na degradację w środowisku wodnym oraz (2) opracowanie sposobu pokrywania ceramicznych mikrogranulek polimerem degradowanym zawierającym klindamycynę a także ocenę ich aktywności przeciwbakteryjnej, cytozgodności i odpowiedzi tkankowej.

Część eksperymentalna pracy (obejmująca w sumie 74 strony) składa się z następujących ośmiu rozdziałów, w których Autorka najpierw opisuje metody pomiarowe (rozdział 7), po czym zestawia i analizuje wyniki z pierwszego (rozdziały 8, 9 i 10) i drugiego (rozdziały 11 i 12) etapu badań. W tym miejscu chciałabym podkreślić, że dobór metod badawczych jest w pełni adekwatny do postawionych celów pracy. Mam tylko jedno pytanie odnoszące się do badań degradacji granulek w PBS (str. 72): Jaką masę granulek poddawano inkubacji? Czy w przypadku każdego materiału była to taka sama masa granulek przypadająca na określoną objętość PBS? Jest to o tyle ważne, że kinetyka procesu degradacji zależy zarówno od rozwinięcia powierzchni jak i masy próbek.

W rozdziale 8 (Charakterystyka materiałów) Doktorantka najpierw dokładnie opisała metodę syntezy proszków hydroksyapatytu i BCP oraz scharakteryzowała ich strukturę chemiczną za pomocą dyfraktometrii rentgenowskiej i spektroskopii w podczerwieni oraz rozwinięcie powierzchni za pomocą metody izotermii BET. Wyniki XRD oraz FTIR zostały jasno zaprezentowane i właściwie zinterpretowane. Mam tylko uwagę do prezentacji zestawień widm FTIR (rys. 24 i 25) – w takim przypadku na osi rzędnych nie powinno podawać się wartości absorbancji. W dalszej części Autorka charakteryzuje właściwości termiczne i zwilżalność poli(D,L-laktydu) i odnosi uzyskane wyniki do danych literaturowych.

W rozdziale 9 czytelnik jest informowany jak otrzymano mikrogranulki ceramiczne i jak je pokrywano warstwą polimeru. Zastanawia mnie tylko opisany sposób suszenia mikrogranulek pokrytych warstwą polimeru na podłożu polistyrenowym (str. 102). Czy Doktorantka nie obawiała się, że mokre granulki, tj. pokryte roztworem polimeru w acetonie nie przylgną do podłoża polistyrenowego i tym samym czy polistyren nie zostanie przynajmniej częściowo rozpuszczony przez pozostały aceton? Czy nie lepiej byłoby zastosować podłoże szklane?

W rozdziale 10 Doktorantka zestawiała wyniki badań mikrostruktury mikrogranulek za pomocą mikroskopii skaningowej i poddała je analizie. Następnie zestawiała wyniki badań procesu degradacji polegające na pomiarze masy w funkcji czasu inkubacji w PBS. Na Wykresach 1 i 4 przedstawiających ubytek masy próbek podano wartości względne w gramach, co bez informacji jaka była początkowa masa granulek, nie pozwala w pełni oszacować stopnia degradacji materiału. Wydaje się też, że albo na Wykresie 2 legenda została zamieniona (zamiast grupy 1 powinna być grupa 2) albo w tekście powyżej zakradł się błąd. Bardzo proszę o wyjaśnienie.

W kolejnym rozdziale 11 najpierw Autorka opisała sposób wytwarzania mikrogranulek ceramicznych i powlekania ich polimerem zawierającym różną ilość klinadamycyny, po czym zaprezentowała wyniki badań aktywności przeciwbakteryjnej

w kontakcie z gronkowcem złocistym – tj. szczepem, który powoduje infekcje w obrębie tkanki kostnej. Rozdział ten zawiera bardzo wartościowe wyniki, jasno zaprezentowane i przedyskutowane, które stanowią niezbitą dowód, że opracowane materiały działają bakteriobójczo przez czas zależny od dawki leku zawieszonego w polimerze.

W rozdziale 12 Doktorantka zaprezentowała wyniki badań cytotoksyczności w kontakcie z fibroblastami, które wykazują, że ekstrakty z opracowanych materiałów nie są cytotoksyczne ani nie powodują zwiększenia produkcji cytokin pro- i przeciwzapalnych. Jest to wynik korzystny, ale nasuwa się pytanie, czy przeprowadzono badania dla większej ilości ekstraktu. Zgodnie z opisem eksperymentu na str. 77 dodano tylko 2 μ l ekstraktu do 200 μ l pożywki, więc ekstrakt został rozcieńczony 100x. Czym Autorka kierowała się stosując tak małe stężenie ekstraktu? W ostatnim podrozdziale pracy Doktorantka zaprezentowała wyniki badań histologicznych na królikach polegające na wszczepieniu opracowanych biomateriałów w doświadczalnie wytworzone ubytki pokrywy czaszki. Wyniki tych badań świadczą o tym, że opracowane materiały przyspieszają proces odbudowy tkanki kostnej. Walory tego rozdziału można byłoby jeszcze bardziej poprawić, gdyby na wszystkich przedstawionych zdjęciach histologicznych zostały podpisane struktury histologiczne, tak jak zostało to zrobione na rys. 50.

Pracę kończą dwa rozdziały: Wnioski i Podsumowanie, które dzięki swojemu syntetycznemu ujęciu bardzo dobrze podsumowują wykonane badania i nakreślają kierunki dalszych prac.

Podsumowując chciałabym podkreślić, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Jelonek jest bardzo dobrze napisana: ma logiczny układ, dobre proporcje pomiędzy częścią literaturową, opisem metodyki badawczej, prezentacją wyników i ich dyskusją. Jest przykładem dobrze przemyślanych i przeprowadzonych prac doświadczalnych, a wyniki w niej opisane mogą stanowić podstawę do wykorzystania w przyszłości opracowanych biomateriałów w badaniach doświadczalnych na większych zwierzętach a potem w badaniach klinicznych. Przytoczone w recenzji sugestie i uwagi krytyczne nie wpływają na moją wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej rozprawy.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska, tak ze względu na wartości naukowe, znaczenie poznawcze i aplikacyjne oraz wysoki poziom warsztatu naukowego, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w myśl ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym i w związku z tym wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Jelonek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

E. Paszura