

Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

Łódź dnia 12.01.2025r.

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki,

Instytut Mikrobiologii Biotechnologii i Immunologii

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej,

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,

Tel: (42) 6354186,

e. mail: magdalena.chmiela@biol.uni.lodz.pl

UNIVERSYTET ŁÓDZKI
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
KATEDRA IMMUNOLOGII I BIOLOGII INFEKCYJNEJ
ul. St. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
tel. (0-48-42) 635-44-72, 635-45-25
faks: (0-48-42) 665-58-18
e-mail: inmik@biol.uni.lodz.pl

dr hab. Anna Wierzbicka-Miernik, prof. Instytutu

Z-ca Dyrektora ds. Ogólnych

Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej

Im. Aleksandra Krupkowskiego

Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

ul. Reymonta 25, 30-059 Kraków

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pana mgr Adama Byrskiego

Przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora pt: „**Bioaktywne implanty, specyficzne dla pacjenta, zapewniające trwałą rekonstrukcję funkcjonalną**”, przygotowana przez Pana mgr Adama Byrskiego, została wykonana w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk. Praca doktorska została przygotowana w formie spójnej tematycznie monografii opracowanej według wzoru typowego dla prac oryginalnych.

Przestanką do podjęcia badań stała się potrzeba opracowania optymalnego biomateriału do rekonstrukcji palców dłoni, w następstwie urazu lub po amputacji wskutek procesu chorobowego. Biorąc pod uwagę fakt, iż utrata palców ogranicza funkcje narządowe dłoni i ma istotny wpływ na psychikę osoby poszkodowanej, poszukiwanie nowych wystandaryzowanych technik rekonstrukcji palców, opartych na nowych lub zmodyfikowanych materiałach, ma charakter priorytetowy. Zatem wyznaczony cel badań zakładający modyfikację powierzchni cienkowarstwowych materiałów tytanowych lub ceramicznych przeznaczonych do opracowania implantów do rekonstrukcji palców

dla polepszenia właściwości mechanicznych, biologicznych i antybakteryjnych tych materiałów jest wysoce uzasadniony.

Autor postawił hipotezę, że można zwiększyć właściwości przeciwbakteryjne materiałów do rekonstrukcji palców ze stopu tytanowego Ti-6Al-4V lub materiału ceramicznego z tlenku cyrkonu utwardzanego tlenkiem aluminium (ATZ220), przez pokrycie tych materiałów hydroksyapatytem lub tym związkami i cząsteczkami cynku lub trójfosforanu wapnia, metodą natryskiwania plazmowego z zachowaniem wytrzymałości mechanicznej zmodyfikowanych materiałów. Ponadto założono, że ta procedura nie nasili działania cytotoksycznego tych materiałów wobec komórek eukariotycznych *in vitro* lub organizmu wielokomórkowego *in vivo*.

Uzasadnienie potrzeby i koncepcji badań zostało poprzedzone dobrze opracowanym wstępem teoretycznym, w którym Doktorant dokonał przeglądu piśmiennictwa naukowego dotyczącego epidemiologii amputacji palców, problematyki replantacji, materiałów stosowanych do rekonstrukcji palców, zastosowania metod przyrostowych w produkcji implantów kości, zakażeń bakteryjnych stanowiących przyczynę powikłań pooperacyjnych, poszukiwania sposobów ograniczających rozwój takich zakażeń oraz opracowania prototypów implantów kości palców o udoskonalonych właściwościach terapeutycznych. Na podkreślenie zasługuje wskazanie przez Doktoranta najważniejszych cech materiałów przeznaczonych do rekonstrukcji palców, w tym: biokompatybilności, właściwości fizycznych i mechanicznych, wytrzymałości i opłacalności ekonomicznej. Ponadto Doktorant wskazał alternatywne metody przygotowania kilkufazowych materiałów rekonstrukcyjnych czwartej generacji, co skutkuje m.in. ulepszeniem powierzchni materiałów, nasileniem ich właściwości kościotwórczych, proregeneracyjnych, przeciwbakteryjnych oraz poprawą właściwości mechanicznych. Jednym z najciekawszych rozwiązań metodycznych jest też wskazana przez Doktoranta możliwość wykorzystania obrazów medycznych do tworzenia spersonalizowanych implantów otrzymywanych metodą technologii druku 3D.

We wstępie do części eksperymentalnej Doktorant scharakteryzował materiały, które zostały wybrane do badań: stop tytanowy Ti-6Al-4V z dodatkiem aluminium i wanadu oraz materiał ceramiczny z tlenku cyrkonu utwardzanego tlenkiem aluminium, które były następnie modyfikowane:

- stop tytanowy poddawano obróbce cieplnej, modyfikowano przez anodowanie i elektropolerowanie, a następnie pokrywanie hydroksyapatytem z uwzględnieniem cynku lub trójfosforanu wapnia,
- materiał ceramiczny napyłano hydroksyapatytem lub hydroksyapatytem i cynkiem

W pracy przygotowano prototypy implantów tytanowo-ceramicznych według projektu specjalisty chirurgii rekonstrukcyjnej i oceniono ich właściwości wytrzymałościowe i biologiczne.

W części doświadczalnej zostały ocenione następujące wyznaczniki umożliwiające walidację badanych materiałów: skład fazowy oraz topografia powierzchni z uwzględnieniem mikro- i makrostruktury, cytotoksyczność bezpośrednia wobec referencyjnych fibroblastów człowieka oraz pośrednia na podstawie poziomu komórkowej dehydrogenazy mleczanowej, właściwości prozapalne na podstawie pobudzenia komórek do wytwarzania cytokin, właściwości mechaniczne i podatność na zużycie oraz właściwości przeciwbakteryjne wobec szczepów wzorcowych *E. coli* lub *S. aureus*, podatność na opłaszczanie endotoksyną, w oparciu o obowiązujące normy. Podczas realizacji części doświadczalnej pracy zastosowane zostały dobrze wyselekcjonowane, nowoczesne i wiarygodne metody badawcze, zarówno inżynierskie jak i biologiczne.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt weryfikacji cech wyselekcjonowanych materiałów rekonstrukcyjnych: anodowego stopu Ti64, a także takiegoż stopu i materiału ceramicznego pokrytych hydroksyapatytem, w odniesieniu do referencyjnego materiału do rekonstrukcji kości (alumina Litholux), w modelu *in vivo* królika, z uwzględnieniem toksyczności podostrej (ISO 10993), badania histopatologicznego, podatności materiału na kolonizację przez drobnoustroje i osadzanie się endotoksyny. Ta część badań, która została wykonana we współpracy z Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach na podstawie zgody lokalnej komisji do spraw doświadczeń na zwierzętach stanowi niezwykle cenne dopełnienie i weryfikację badań pozaustrojowych.

Rozdział Materiał i metody został opracowany z dużą starannością, z uwzględnieniem szczegółów dotyczących poszczególnych procedur, w oparciu o dobrze opracowane ryciny i schematy. W mojej opinii dobrze by było zamieścić w tej części pracy zestawienie badanych materiałów z uwzględnieniem zastosowanych modyfikacji i dodatkowych procedur jakim zostały poddane, a także doświadczeń w których były walidowane.

Drobna uwaga dotyczy pochodzenia stosowanych odczynników i urządzeń pomiarowych. Zgodnie z przyjętą międzynarodową praktyką dane te powinny zawierać nazwę producenta oraz jego siedzibę z uwzględnieniem miasta i państwa.

W części eksperymentalnej dotyczącej badań *in vivo* brakuje też informacji o uprawnieniach eksperymentatora.

Wyniki badań, z podziałem na poszczególne zadania, zostały opisane w rozdziale V i zobrazowane w formie fotografii, rycin, wykresów pomiarowych i dokumentacji tabelarycznej. Nie podano informacji dotyczącej liczby powtórzeń oznaczeń biologicznych oraz analizy statystycznej wyników. W opisach pod rycinami brakuje wyjaśnienia, co w danym eksperymencie stanowiło kontrolę dodatnią lub ujemną.

Opis wyników obejmuje:

- ocenę topografii badanych materiałów, ich mikrostruktury i składu chemicznego,
- ocenę właściwości mechanicznych i trybologicznych (wskaźnik zużycia i współczynnik tarcia
- próby wytrzymałościowe,
- badania biogodności, w tym wytwarzania cytokin w hodowlach komórkowych *in vitro*,
- analizy biomechaniczne, w tym długoterminowe badanie zużycia stawu, rozciąganie i ścinanie prototypów,
- cytotoksyczność produktów zużycia ,
- analizy mikrobiologiczne,
- ocenę depozycji endotoksyny na powierzchni badanych materiałów,
- ocenę biogodności *in vivo*,
- mikrobiologiczne analizy podeplantacyjne

Wyniki badań zostały opisane szczegółowo dla poszczególnych wariantów materiałów rekonstrukcyjnych. W mojej opinii dobrze by było, aby w pracy znalazło się też zbiorcze, być może tabelaryczne, zestawienie uzyskanych wyników badań, które umożliwiłoby wytypowanie materiału rekonstrukcyjnego o najlepszych właściwościach. **Proszę Doktoranta o uściślenie informacji zawartej na stronie 63, cytując: „Na rysunkach 29 i 30 przedstawiono poziom cytokin na powierzchni badanych materiałów”. Ta sama informacja przewija się dalej w Dyskusji. Czy nie powinno być „ w płynie pochodowym”?**

Na podstawie zamieszczonych w pracy wyników, Doktorant wysnuł następujące wnioski, które są zbieżne z celem badań:

- zastosowanie powłok z hydroksyapatytu lub hydroksyapatytu i cynku wraz z procedurą elektropolerowania i anadowaniem pozwala na osiągnięcie wytrzymałości materiału podobnej do wytrzymałości kości,
- wprowadzone modyfikacje nie spowodowały zmniejszenia biokompatybilności badanych materiałów,

- otrzymane materiały po modyfikacji hydroksyapatytem lub hydroksyapatytem i cynkiem wykazywały kontaktowe właściwości przeciwbakteryjne i spowalniały kolonizację, co może ograniczać występowanie zakażeń pooperacyjnych *in vivo*. Jednakże te efekty były słabsze po zastosowaniu procedury elektropolerowania i anodowania. **Odnosnie badania biologicznego dotyczącego depozycji endotoksyny prosiłabym o komentarz do rysunku 48. Jak wytłumaczyć wysoki poziom endotoksyny na niektórych próbkach po deplanacji, przy braku wzrostu drobnoustrojów (Tabela 5).**

- opracowane prototypy tytanowe, ale nie ich części ceramiczne, cechowały się znaczną wytrzymałością,

- materiały tytanowe i ceramiczne modyfikowane hydroksyapatytem były biozgodne *in vivo*, nie hamowały procesu gojenia i nie ulegały kolonizacji przez bakterie.

Biorąc pod uwagę opis wyników i wnioski wynikające z badań prosiłabym Doktoranta o podsumowanie i walidację badanych materiałów pod kątem: biozgodności, parametrów technicznych, działania przeciwbakteryjnego i proregeneracyjnego, i wybór materiału optymalnego.

Prosiłabym również o komentarz do niektórych zastosowanych procedur, które z jednej strony powodują poprawę właściwości materiału lub ich pogorszenie np. elektropolerowanie i anodowanie zwiększają wytrzymałość materiału ale zmniejszają jego działanie przeciwbakteryjne. Czy w takiej sytuacji możliwe są inne rozwiązania metodyczne ?

W świetle uzyskanych wyników nasuwa się również pytanie jakie są dalsze wytyczne dotyczące możliwości łączenia elementów tytanowych i ceramicznych w prototypach protez kostnych, biorąc pod uwagę różnice w wytrzymałości obu materiałów.

Dyskusja

W Dyskusji Autor odniósł wyniki badań własnych do wyników innych autorów, zwłaszcza do tych danych, które weryfikują wpływ zastosowanych modyfikacji na właściwości biologiczne materiałów. Zwrócił uwagę na sugestie użycia w badaniach komórek kościotwórczych. **Czy są zatem dalsze plany badania otrzymanych materiałów w zakresie badań biologicznych z zastosowaniem komórek kościotwórczych i dedykowanych tym komórkom czynników wzrostowych?**

Doktorant podkreślił wagę badań w kierunku określenia potencjału prozapalnego materiałów do wytwarzania implantów, co może mieć wpływ na powodzenie implantacji i proces regeneracji tkanek.

Podkreślił również znaczenie analiz biomechanicznych, które w Jego badaniach wykazały różnice w wytrzymałości zastosowanych materiałów, które są używane łącznie do konstrukcji implantów.

Dyskusja jest dowodem dobrej znajomości przez Doktoranta tematyki dotyczącej materiałów do implantacji i wymagań, jakie takie materiały powinny spełniać zarówno pod względem wytrzymałościowym jak i biologicznym.

Piśmiennictwo zostało dobrze wyselekcjonowane pod kątem tematyki badań i poprawnie zacytowane.

Uwagi językowe i edytorskie:

W pracy odnotowano pewne błędy edytorskie o charakterze literowym, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

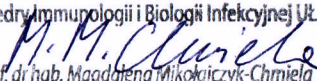
Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny monografia **spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U.2023 poz. 742)**. Na tę opinię składają się wyznaczone cele pracy, plan badań, sposób ich wykonania, prezentacja i analiza uzyskanych wyników oraz rzetelna dyskusja. Efekty tych badań zaprezentowanych w formie rozprawy doktorskiej, potwierdzają szeroką wiedzę i umiejętności Doktoranta w zakresie metod inżynierii materiałów rekonstrukcyjnych oraz metod i modeli *in vitro* i *in vivo*, wymaganych do weryfikacji właściwości biologicznych tych materiałów, co upoważnia mnie do przedłożenia Radzie Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie wniosku o dopuszczenie Pana mgr Adama Byrskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość poznawczą badań i ich istotny aspekt aplikacyjny, w zakresie ochrony zdrowia ludzi, składam do Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie wniosek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Z wyrazami szacunku,

Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

KIEROWNIK
Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UK

prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela