



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiedzy

dr. hab. inż. Barbara Jachimska prof. IKiFP PAN

Kraków 10.02.2019

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera

Polska Akademia Nauk

Recenzja pracy doktorskiej mgr. inż. Klaudii Pluty

pt. „Kompozyty fosforanów wapnia do zastosowań w inżynierii tkankowej”

Przedstawiona praca doktorska mgr. inż. Klaudii Pluty pt. „Kompozyty fosforanów wapnia do zastosowań w inżynierii tkankowej” została wykonana na Politechnice Krakowskiej im. T. Kościuszki na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej pod kierunkiem promotora dr. hab. inż. Agnieszki Sobczak-Kupiec oraz promotora pomocniczego dr. inż. Dagmary Maliny. Praca była realizowana w ramach projektu Lider pt. „Innowacyjne biomateriały kompozytowe zawierające bioaktywne fosforany wapnia” NCBiR.

Tematyka pracy podjęta przez doktorantkę nie jest przypadkowa, to kontynuacja zagadnień prowadzonych od lat w grupie dr. hab. inż. Agnieszki Sobczak-Kupiec. Zasadniczym celem pracy było opracowanie metody otrzymywania oraz charakterystyki fizykochemicznej materiałów opartych na fosforanie wapnia pochodzenia naturalnego jako składnika materiału kompozytowego oraz weryfikacja własności otrzymanych materiałów kompozytowych w kontekście ich zastosowania w inżynierii tkankowej.

Kość jest naturalnym materiałem konstrukcyjnym zróżnicowanym anatomicznie co do wielkości i kształtu ze względu na funkcję jakie pełni w organizmie. Z chemicznego punktu widzenia jest materiałem biokompozytowym o budowie warstwowej (hierarchicznej) opartym głównie na fosforanie wapnia oraz kolagenie. Chcąc zbliżyć się do naturalnej struktury kości oraz funkcji jakie pełni w organizmie, odtworzenie jej warstwowej struktury wydaje się bardzo istotne. Dodatkowo w naturalnych warunkach w procesie budowy kości uczestniczą białka, które odgrywają bardzo ważną rolę w procesie mineralizacji. O ile strukturalna budowa kości jest dobrze znana i przebadana, to mechanizm działania rozpuszczalnej matrycy białkowej jest nadal niepoznany. Wiadomo, że spełnia ona kluczową rolę jako promotor wzrostu fosforanu wapnia, potwierdzają to badania syntezy fosforanu wapnia w obecności organicznych modyfikatorów.

Materiały mieszane (kompozyty) ceramiczno-metaliczne czy ceramiczno-organiczne o regulowanej teksturze i mikrostrukturze, dobrych parametrach mechanicznych, mocnym powiązaniu z kością i w pełni biogodne, są materiałami, które w pełni odpowiadać będą wymaganiom stawianym

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska

tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23

fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego

PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004

NIP: 6750001805, REGON: P-000326351

Wpłynęło dnia 13.02.19

L.Dz. 432 / 2019



nowoczesnym materiałom stosowanym w medycynie. Model syntezy nowej klasy materiałów implantacyjnych na bazie organicznej matrycy, w którą wbudowuje się bioaktywne nanocząstki ceramiczne, jest modelem zbliżonym do naturalnie tworzonej struktury kości. Matryca organiczna spełnia różnorodną funkcję: zapewnia odpowiednią strukturę tworzonego kompozytu, przyspiesza proces mineralizacji, umożliwia wbudowywania zarówno białek jak i białek. W przedstawionej pracy, aby taki model zastosować przebadano zarówno właściwości fizykochemiczne cząstek mineralnych, właściwości samych modyfikatorów organicznych oraz mechanizm rządzący tworzeniem matrycy polimerowej.

Recenzowana praca składa się z 10 rozdziałów obejmujących wprowadzenie, cel i zakresu pracy część teoretyczną (45 stron), część doświadczalną (24 strony), wyniki i dyskusję (54 strony), wnioski, streszczenie, podsumowanie, dorobek własny oraz literaturę (252 pozycje). Rozprawa jest bogato ilustrowana graficznie rysunkami (54), schematami i tabelami (24), co ułatwia czytelnikowi zrozumienie przedstawionych metod badawczych oraz wyników. Mimo, że w pracy można znaleźć błędy językowe, od strony edycyjnej praca przygotowana jest dobrze.

W części doświadczalnej autorka przedstawia odczynniki wykorzystane do poszczególnych procedur eksperymentalnych oraz techniki stosowane do charakterystyki fosforanów wapnia (analiza składu fazowego (XRD), analiza powierzchni właściwej (BET), analiza elementarna (ICP-OES, AAS), analiza morfologii (SEM), analiza termiczna (TG/DTG/DTA)) oraz charakterystyki materiałów kompozytowych (analiza strukturalna (ATR-FTIR), oznaczanie chłonności materiałów, analiza termiczna (TG/DTG), wytrzymałość na rozciąganie, wytrzymałość na ściskanie, analiza chropowatości (Profilometr), badania cytotoksyczności, obrazowanie konfokalne, badanie właściwości prozapalnych). Taka różnorodność technik pomiarowych pokazuje, iż autorka opracowała uzyskane wyniki badawcze wielopłaszczyznowo..

Prace doświadczalne zostały podzielone na trzy etapy przedstawione schematycznie na str. 57 i obejmują: opracowanie metodologii otrzymywania fosforanów wapnia, opracowanie metodologii otrzymywania kompozytów polimerowo-ceramicznych oraz charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych materiałów.

W badaniach zastosowano dwa alternatywne źródła fosforanu wapnia dlatego opracowano dwie metodologie jego otrzymywania. Metoda I dotyczyła pozyskanie fosforanu wapnia ze skorupki jaj kurzych, metoda II z kości wieprzowych. Analiza rentgenowska potwierdziła, iż otrzymany metodą I fosforan wapnia składa się wyłącznie z hydroksyapatytu, a stosunek Ca/P zależnie od temperatury kalcynacji zmienia się w zakresie od 1,65-1,72. Natomiast dla metody II otrzymany fosforan wapnia zawiera dwie fazy krystaliczne trójfosforan wapnia oraz hydroksyapatyt, ponadto przy kalcynacji > 750 °C obserwuje się występowanie dodatkowo pirofosforanu wapnia (C₂P). Materiał ten charakteryzuje się wartością Ca/P wzrastającą wraz z temperaturą kalcynacji w zakresie 1,42 do 1,72.

Następny etap pracy obejmował optymalizację własności matrycy polimerowej w skład której wchodzi żelatyna (Gel), poli(winylopirolidon) (PVP), albumina (BSA), kwas asparaginowy (Asp). Trzeba podkreślić, iż wszystkie wybrane składniki matrycy charakteryzują się wysoką biokompatybilnością.



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiedzy

Przebadano 4 różne typy matryc polimerowych: PVP/Gel, PVP/Gel/BSA, PVP/Gel/Asp, PVP/Gel/BSA/Asp. Własności matrycy polimerowej kontrolowano poprzez analizę chłonności zależnie od zawartości czynnika sieciującego (diakrylan poli(glikolu etylenowego)(PEGDA)) oraz fotoinicjatora (2-hydroksy-2-metylopropiofenonu). Analiza SEM wykazała bardzo zróżnicowaną morfologię uzyskanych matryc wynikającą z ich składu.

Następną częścią badań autorka poświęciła charakterystyce fizykochemicznej materiałów kompozytowych opartych na opracowanych matrycach organicznych zawierających fosforany wapnia otrzymane metodą I, metodą II oraz zawierające komercyjny hydroksyapatyt HAp. Ze względu, iż materiały kompozytowe były opracowywane w celu ich aplikacji w inżynierii biomedycznej podstawowe badania obejmujące FT-IR, SEM, TG, BET zostały rozszerzone o badania chłonności oraz własności mechanicznych. Trzeba podkreślić, iż badania te są bardzo ważne, gdyż dla prawidłowej integracji implantu z kością istotne jest, aby w warstwie powierzchniowej implantu obecne były pory o odpowiedniej wielkości. Z uwagi na negatywny wpływ porowatości na wytrzymałość mechaniczną, udział objętościowy zarówno mikro- meso- i makroporów powinien być odpowiednio kontrolowany.

W ostatniej części pracy autorka przedstawiła badania dotyczące cytotoksyczności oraz własności prozapalnych. Ocenę cytotoksyczności przeprowadzono na komórkach mysich fibroblastów L929. Test wykazał, iż matryce polimerowe M1-M4 nie wykazują właściwości cytotoksycznych, żywotność fibroblastów po 24 h we wszystkich przypadkach jest na poziomie powyżej 70%. Własności prozapalne przeprowadzono dla linii monocytów ludzkich THP-1XBlue. Najmniej korzystne własności posiada matryca M2 oraz materiał KK4 zawierający hydroksyapatyt komercyjny.

Cześć doświadczalna kończy się wnioskami z przeprowadzonych badań. Recenzent ma pewien niedosyt, ponieważ spodziewał się tu szerszego podejścia do otrzymanych wyników i podkreślenia bardzo ciekawych poniekąd badań popartych dużą liczbą różnorodnych metod eksperymentalnych.

Dorobek mgr. inż. Klaudii Pluty obejmuje 7 publikacji z IF od 0,385 do 3,231, łącznym IF = 10,534. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż w czterech publikacjach mgr. inż. Klaudii Pluta jest pierwszym autorem. Ponadto autorka brała udział w opracowaniu 3 zgłoszeń patentowych. Posiada również spory dorobek konferencyjny, w ciągu realizacji pracy doktorskiej uczestniczyła w konferencjach krajowych oraz zagranicznych.

Pomimo, że prace uważam za dojrzałą i wartościową, jej główną wadą jest moim zdaniem brak pogłębionej analizy wielu obserwacji oraz chwilami zbyt lakoniczne opisy przeprowadzonych badań oraz analiz. Braki te są rekompensowane przez imponujące spektrum metod badawczych, które doktorantka stosowała do analizy swoich badań.

Przy ogólnej wysokiej ocenie rozprawy, chciałabym zwrócić uwagę na kilka niejasności występujących w pracy. Z uwagi na rolę recenzenta przedstawiam je poniżej:



Uwagi merytoryczne:

Str.64 Przedstawiono sposób przygotowania próbek proszków do badań SEM, brak jest opisu przygotowania próbek dotyczących badań morfologii kompozytów. Podobnie niepełny opis dotyczy metody FT-IR na str.69.

Str. 75 Na rys. 21 autorka porównuje dyfraktogramy fosforanu wapnia otrzymanego metodą I pochodzących z jaj kurzych oraz komercyjnego hydroksyapatytu HAp. Dyfraktogram otrzymany dla komercyjnego materiału sugeruje, iż nie był on wcześniej poddany kalcynacji, szerokość pików większa w porównaniu do innych materiałów.

Str. 76 /Str. 87 Widma FT-IR przedstawione na rys. 22 oraz 27 wykazują obecność pików odnoszących się do obecności grup CO_3^{2-} . Brak w tekście interpretacji tego faktu.

Str. 78 Na str. 78 mamy sformułowanie ...powierzchnia mieści się w zakresie $17\text{-}82\text{ m}^2/\text{g}$ podobnie do naturalnej kości $87\text{-}100\text{ m}^2/\text{g}$.

Nie zgodzę się w tej kwestii z autorką, zakres powierzchni właściwej otrzymanych materiałów odbiega od wartości występujących dla materiałów pochodzenia naturalnego.

Str. 85 Na dyfraktometrach przedstawionych na rys. 26 brak identyfikacji o jaki trójfosforan wapnia TCP chodzi, czy mamy do czynienia z formą α czy β .

Str. 93 W tabeli 19 podano średnią lepkość, bez podania odchylenia standardowego dla przedstawionych wyników. Ponadto w sekcji dotyczącej otrzymywanie materiałów kompozytowych brak opisu metodologii pomiarów lepkości.

Str. 98/99/108 Sformułowaniaanaliza właściwości pęcznienia, ...Właściwości pęcznienia orazobniżenie właściwości pęcznienia, ...wartość spęcznienia

Zastosowane sformułowania są użyte nieadekwatnie, gdyż omawiają wyniki przedstawione na rys. 32 dotyczące analizy chłonności materiałów hydroksyapatytowych HAp.

Str. 93 Na str. 93 mamy stwierdzenie, iż najkorzystniejsze stężenie PVP to 15%.

Autorka nie podała w opisie badań, co było podstawą takiego wyboru zwłaszcza, że wyniki lepkości dla stężenia PVP 17.5 % są bardzo zbliżone.

Str. 109 Przedstawiona przez autorkę analiza EDS pokazuje podobną dystrybucję pierwiastków w próbkach K1 i K2 oraz K3 i K4, natomiast KK4 odbiega od pozostałych i nie wykazuje występowania skupisk charakterystycznych dla pozostałych próbek. Brak omówienia tego faktu w tekście.

Str. 109 Sformułowanie ...porowatości uzyskanych materiałów...



Badania z zastosowaniem techniki SEM umożliwiają obserwacje topografii materiałów, a tym samym porów otwartych widocznych w badanej próbce. Niestety nie mogą być one podstawą do analizy porowatości, a jedynie służyć do porównania morfologii badanych próbek.

Str. 112 Autorka stwierdza, iż najwyższą chropowatość charakteryzuje się matryca M4. Należy jednak zauważyć, iż w przypadku matrycy M2 mamy bardzo zbliżone wartości parametry Ra jak i Rz. Obie matryce zawierają w swoim składzie dodatek albuminy.

Str.113 Należałoby zmienić opis osi na Rys. 43 dotyczących parametrów chropowatości Ra i Rz, bo obecny zapis sugeruje, iż przedstawia względny stosunek obu parametrów.

Str. 121 Należy zauważyć korelację, która pokazuje iż przeżywalność fibroblastów spada wraz ze obniżeniem zawartości PVP w matrycy polimerowej. W matrycy M1 na poziomie 106,3% zawartość PVP 2,0, a matrycy M4 na poziomie 75,3% przy zawartości PVP 1,0.

Podobnie przedstawia się ocena toksyczności w przypadku materiałów kompozytowych K1, K2, K3, K4 oraz KN4, jedynie materiał kompozytowy oparty na komercyjnym hydroksyapatycie wykazuje podwyższony poziom toksyczności. Niestety brak w opisie temperatury kalcynacji komercyjnego HAp, co może mieć istotne znaczenie na morfologię otrzymanego kompozytu, a tym samym na jego cytotoxyczność.

Uwagi dotyczące strony edycyjnej pracy:

Praca generalnie napisana jest w sposób zrozumiały dla czytelnika, jednak w tekście zdarzają się nieliczne błędne sformułowania np.

Str. 12 Na str. 12 autorka wprowadza termin materiałach II generacji, a brak w tekście informacji o materiałach I generacji.

Str. 33 Brak wprowadzenia skrótu dotyczącego oznaczenia hydroksyapatytu HAp

Str. 43 Dane zamieszczone w tabeli 4 pochodzą z różnych źródeł i wszystkie te źródła powinny być zacytowane.

Str. 51 Na str. 51 słowo interakcje bardziej odpowiednie byłoby użycie słowa oddziaływanie

Str. 60 Nie podano autorów opracowanej metody wg. literatury[202]

Str. 65/93 Autorka nie podane przy jakiej długości fali z zakresu UV wykonano proces sieciowania.

Str. 66 W tab. 7 zastosowano skrót M.W. powszechnie jest przyjęty zapis w formie Mw

Str. 69 Sformułowanie dotyczące próbek o kształcie okręgu należy przereklamować.

Str. 90 Sformułowanie ...zwiększającą się objętością zastosowanego kwasu mlekowego

Chyba chodzi o zwiększający się udział objętościowy kwasu mlekowego w układzie.



Str. 95 W pracy należałoby ujednoczyć skrót stosowany dla metody ATR-FTIR, bo w całej pracy są stosowane aż 3 różne.

Str. 104 W tabeli 21 skrót Alb powinien być Asp

Str. 108 Sformułowanie ..zdolność przenikania..

W przedstawionym kontekście bardziej odpowiednie będzie sformułowanie ... zdolność dyfuzji cząsteczek wody.

Str. 108 Sformułowanieniski stopień chłonności roztworu PBS....

Ten fragment tekstu należałoby przeredagować.

Str. 113 Na kilku rysunkach w opisach autorka stosuje skrót SD, należałoby go zdefiniować.

Str. 135 W niektórych pozycjach brakuje danych bibliograficznych.

Powyższe uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej opinii na temat recenzowanej pracy doktorskiej. Przedstawione przez doktorantkę badania mają dużą wartość poznawczą oraz aplikacyjną. Otrzymane wyniki badawcze pozwoliły w pełni osiągnąć autorce cel rozprawy dotyczący otrzymania kompozytów fosforany wapnia do zastosowań w inżynierii tkankowej. Nie każde wybrane opracowania zapewniły otrzymanie materiałów o optymalnych własnościach. Autorka pokazała, że umie sformułować cele badawcze i planować eksperymenty w celu ich osiągnięcia. Wybór szerokiej gamy metod eksperymentalnych dowodzi, iż mgr. inż. Klaudia Pluta jest dojrzałym naukowcem i zasługuje na stopień naukowy doktora nauk technicznych.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca doktorska przedstawia istotną wartość pod względem poznawczym i aplikacyjnym, a tym samym posiada elementy nowości w dziedzinie nauk technicznych. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Klaudii Pluty pt. „Kompozyty fosforanów wapnia do zastosowań w inżynierii tkankowej” spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003 poz. 595). Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Chemii i Technologii Chemicznej PK o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. Klaudii Pluty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Barbara Jachimska, prof. IKiFP PAN