

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ p.t.  
„Kompozyty fosforanów wapnia do zastosowań  
w inżynierii tkankowej”  
wykonanej przez KLAUDIĘ PLUTĘ

Nauka o technologii wytwarzania materiałów przeznaczonych do rekonstrukcji zużytych lub uszkodzonych tkanek naturalnych organizmu żywego przyczyniła się do wytworzenia dużej ich różnorodności i szerokich zastosowań w chirurgii. Większość stanowią materiały jednofazowe takie jak stopy tytanu, tlenek cyrkonu, ceramika tlenku glinu. Owe materiały nie wywołują stanów zapalnych, ale ich właściwości fizyczne i mechaniczne takie jak moduł Younga, kruchość, sprężystość są zbyt odległe od właściwości tkanek naturalnych co nie rzadko powoduje osłabienie i resorpcję tkanki żywej wokół implantu i pacjent narażony jest na kolejną interwencję chirurga.

Nową generację materiałów, zaczęto tworzyć na przełomie naszych wieków. Są to kompozyty najczęściej z udziałem polimerowej fazy organicznej stanowiącej osnowę i bioaktywnej fazy nieorganicznej pełniącej rolę wypełniacza. Osnowa organiczna ma zapewnić integralność materiału, elastyczność, kształt, natomiast tzw wypełniacz stanowiący fazę rozproszoną w osnowie, ma wzmocnić właściwości mechaniczne i bioaktywne, stymulujące narastanie nowej tkanki w warunkach „*in vivo*”. Pożądanym materiałem jest taki, który po wszczepieniu wypełniłby ubytek tkanki naturalnej a następnie uległby stopniowej resorpcji umożliwiając zagnieżdżenie się komórek macierzystych, które po przekształceniu się w komórki specyficzne dla określonej tkanki, na przykład osteoblasty dla kości, rozpoczęłyby tworzenie nowej tkanki w miejscu uszkodzenia tej pierwotnej.

#### **Cel pracy.**

Recenzowana praca doktorska nawiązuje właśnie do nowej generacji biomateriałów. Celem tej pracy było otrzymanie materiałów, w których organiczna faza polimerowa ma być zintegrowana z fazą mineralną poprzez proces sieciowania.

Otrzymany materiał powinien charakteryzować się właściwościami fizykochemicznymi i bioaktywnymi potencjalnie przydatnymi przy rekonstrukcji ubytków tkanki łącznej oporowej takiej jak tkanka kostna, ewentualnie chrzęstna.

Opracowane przez doktorantkę materiały mają być w zamyśle syntetycznym odpowiednikiem naturalnej tkanki kostnej, w której sieć z włóknistej tkanki kolagenowej jest „zacementowana” fosforanem wapnia o strukturze apatytowej – takiej jaka występuje w naturalnej kości.

SEKRETARIAT WIITCH

Wpłynęło dnia... 12.02.2019

L.Dz. .... 419/19

Przedstawiona do recenzji praca zawiera szereg obszernych rozdziałów, które składają się na część literaturową i doświadczalną.

**Część literaturowa** dotycząca przedmiotu pracy, oparta na analizie ponad 250 zacytowanych prac, została obszernie opisana na ponad 50 stronach pracy o pojemności 150 stron.

### **Część doświadczalna**

#### Metodyka badań

Ze względu na złożoność składu chemicznego i fazowego zaplanowanego przez doktorantkę biomateriału w postaci kompozytu, który miał zawierać fazę nieorganiczną rozproszoną w matrycy organicznej, proces jego tworzenia wymagał zastosowania dwóch rodzajów materiałów w charakterze surowca 1) nieorganicznego oraz 2) organicznego. Aby przetworzyć te bardzo różne materiały w kompozyt doktorantka zastosowała dwie bardzo różniące się od siebie technologie.

- 1) Technologia syntezy fazy nieorganicznej, którą stanowił fosforan wapnia o strukturze hydroksyapatytu, HAP, taki z którego zbudowana jest kość naturalna. Do otrzymania HAP wykorzystano 2 rodzaje surowca pochodzenia naturalnego, a mianowicie,
  - a) Skorupę jaj kurzych oraz
  - b) Kości wieprzowe.
  
- 2) Synteza polimerowej osnowy organicznej – usieciowanej matrycy pełniącej funkcję ośrodka rozpraszającego fazę mineralną. Wykorzystano do tego odczynniki handlowe.
  - a) Poli(winylopirolidon)- dalej zwany PVP,
  - b) Żelatynę,
  - c) Serum albuminy wołowej, BSA i
  - d) Kwas asparaginowy,
  - e) Do procesu sieciowania osnowy organicznej doktorantka zastosowała diakrylan poli(glikolu etylenowego), w skrócie oznaczonego jako PEGDA, 2-hydroksy-2-metylopropiofenon w charakterze fotoinicjatora oraz promieniowanie UV.
  
- 3) Zintegrowanie materiałów z powyższych 2-ch syntez dało 2 rodzaje produktu finalnego w postaci kompozytu polimerowo-nieorganicznego. Te 2 rodzaje produktu wynikało z zastosowania 2-ch różniących się składem fazowym i strukturą rodzajów surowca fosforonośnego, tj skorupy kurzych jaj lub kości wieprzowe.

Do identyfikacji i charakterystyki fazy nieorganicznej, składnika docelowego kompozytu na bazie polimeru organicznego doktorantka zastosowała cały szereg wymienionych niżej metod.

- a) Analiza elementarna techniką atomowej spektroskopii emisyjnej (ICP-OES – Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometers) oraz metodą AAS (Atomic Absorption Spectrometry).
- b) Badanie składu fazowego : XRD, FTIR.
- c) Analiza powierzchni właściwej metodą BET. Wyznaczono powierzchnię właściwą, właściwości porozymetryczne obejmujące całkowitą powierzchnię oraz objętość porów, średnią szerokość porów oraz udział porów (porowatość) w materiałach ceramicznych.
- d) Analiza morfologii kryształów metodą SEM (Scanning Electron Microscopy) oraz zawartości pierwiastków metodą EDS (Energy Dispersive Spectrometry).
- e) Analiza termiczna TG/DTG/DTA.

Dla charakterystyki półproduktów i finalnych materiałów kompozytowych zastosowano te same w/w metody badań fazowych oraz dodatkowo metody badań właściwości biologicznych.

- f) Oznaczenie chłonności roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanem PBS o pH 7.4.
- g) Przebieg procesów degradacji termicznej w atmosferze powietrza podczas ogrzewania do 1000° C.
- h) Parametry wytrzymałościowe, takie jak wytrzymałość materiału na rozciąganie, oraz na działanie sił ściskających.
- i) Analiza i charakterystyka chropowatości powierzchni.
- j) Biokompatybilność (biogodność) kompozytów została zweryfikowana badaniami cytotoksyczności wykorzystując linię komórkową mysich fibroblastów L929.
- k) Właściwości prozapalne weryfikowano wykorzystując linię komórkową ludzkich monocytów.

Podsumowując metody badań, wytworzony przez doktorantkę materiał przeszedł więc szereg badań chemicznych, badania struktury, wytrzymałości mechanicznej oraz testów biologicznych opartych na hodowli żywych komórek na wytworzonym materiale.

### **Dyskusja wyników**

- 1) Doktorantka wykazała związek pomiędzy rodzajem surowca wykorzystanego w pracy a rodzajem otrzymanego produktu.

Do wytworzenia matrycy polimerowej dla wieloskładnikowych organiczno-nieorganicznych kompozytów doktorantka wykorzystwała cały szereg odczynników handlowych.

Natomiast, składnik mineralny, tj fosforan wapnia o strukturze hydroksyapatytu pełniący rolę wypełniacza matrycy, doktorantka wyprodukowała osobiście wykorzystując dwa odmienne rodzaje surowca naturalnego: a) skorupki kurzych jaj i b) surowe kości wołowe. Ze względu na różne pochodzenie surowców wyjściowych i różny ich skład i zawartość składników mineralnych i organicznych musiała zastosować zróżnicowaną technologię ich

przetwarzania na pół-produkt, przydatny do dalszej syntezy kompozytu nieorganiczno-organicznego.

Posługując się analizą termiczną w zakresie temperatur 20 – 1200° C wspomaganą badaniami struktury metodą XRD oraz FTIR wykazała że:

- a) Finalnym produktem kalcynowania skorupek jaj jest czysty tlenek wapnia CaO. Zastosowała go do wyprodukowania czystego fosforanu wapnia o strukturze HAP. Wyprodukowała go metodą strącania, wykorzystując roztwór kwasu fosforowego a następnie kalcynując strącony produkt. Badania fizyko-chemiczne wykazały, że produkt otrzymany ze skorupy jaj spełnia międzynarodowe wymogi ISO odniesione do implantów przewidzianych dla chirurgii tkanek twardych.
- b) Natomiast, w przypadku kości wieprzowych, przetwarzanie ich na materiał przydatny do dalszej syntezy polimeru nieorganiczno-organicznego wykonała w zupełnie inny sposób. Kości przed obróbką termiczną były traktowane kwasem mlekowym w różnym stosunku masowym. Skład fazowy produktów obróbki termicznej, zwanej dalej kalcynacją, zależał nie tylko od temperatury, zależał również od ilości kwasu mlekowego, którym kość była traktowana przed kalcynacją, co ilustrują dyfraktogramy na Rys. 26.

Z porównania dyfraktogramów 3-ch serii (A, B, C na str 85) próbek traktowanych kwasem mlekowym, a następnie kalcynowanych w różnych temperaturach w zakresie 750 – 1050°C wynikło, że traktowanie szlamu kostnego kwasem mlekowym przed kalcynacją sprzyja tworzeniu się materiału dwu-fazowego: HAP + TCP (TCP = fosforan tri-wapniowy). Przy czym ilość TCP wzrasta wraz ze wzrostem ilości kwasu mlekowego. W serii C, w której użyto największą ilość kwasu mlekowego, po kalcynacji w 1050° C nie widać już w ogóle krystalicznej fazy HAP. Widać tylko TCP. Można by więc wyciągnąć błędny wniosek, że cały w swej masie HAP przetworzył się w TCP, a przecież to nie jest możliwe dlatego, że stosunki molowe Ca/P w nich są różne. Stosunek molowy Ca/P w HAP wynosi 1.67, natomiast w TCP Ca/P = 1.5. Powstaje więc pytanie o niewidoczną na dyfraktogramach postać fazy konsumującej nadmiarową w stosunku do TCP ilość moli Ca???

Niezależnie od odpowiedzi na powyższe pytanie, należy podkreślić, że obecność TCP w biomateriałach fosforanowych nie jest wadą tylko zaletą. Dlaczego? HAP jest najtrudniej rozpuszczalnym fosforanem wapnia (Iloczyn rozpuszczalności rzędu  $10^{-50}$ ) co w praktyce oznacza, że jest materiałem praktycznie nierozpuszczalnym w wodnym środowisku biologicznym, innymi słowy jest nie resorbowalny w organizmie żywym. Domieszka łatwiej rozpuszczalnego TCP w hydroksyapatycie czyni biomateriał dwufazowym (HAP + TCP) częściowo resorbowalnym. Stało się to m.i. powodem do wygenerowania dzisiaj już powszechnie znanych biomateriałów dwu-fazowych znanych jako BCP (Biphasic Calcium Phosphates) zawierających i HAP i TCP.

- 2) Reakcja tworzenia się hydroksyapatytu przedstawiona na str 60 jest podręcznikowym

zapisem życzeniowym wg stechiometrii  $\text{Ca/P} = 1.67$ . Taki zapis odzwierciedla faktycznie reakcję, gdy zachodzi ona w fazie stałej w środowisku pary wodnej w temperaturach rzędu  $900 - 1000^\circ \text{C}$ . Powstaje wówczas hydroksyapatyt wg stechiometrii tej właśnie reakcji, ale ma strukturę jednoskośną. Natomiast, w środowisku wodnym, jak w przypadku ocenianej pracy, tworzy się hydroksyapatyt o dość luźnej strukturze heksagonalnej, niestechiometryczny, zwykle z niedomiarem Ca, o stosunku molowym Ca/P zależnym przede wszystkim od pH roztworu, czego zapis reakcji na tr 60 nie uwzględnia. Kompensacja różnicy ładunku wynikająca z niestechiometrii następuje poprzez jednoczesne wbudowanie w strukturę hydroksyapatytu jonów  $\text{HPO}_4^{2-}$  w miejsce  $\text{PO}_4^{3-}$  jonów  $\text{CO}_3^{2-}$  w pozycję  $\text{PO}_4^{3-}$  lub  $(\text{OH})^-$ . Podobne zjawiska mają miejsce również w tkankach kostnych ludzi i zwierząt. Obecność niektórych z wymienionych jonów widoczna jest również w recenzowanej pracy na widmach FTIR nawet po procesie kalcynacji, na przykład na rysunku 27. Kompensacja ładunków elektrycznych dodatkowo zachodzić może również poprzez wbudowanie się obcych metali w pozycjach Ca, jeżeli materiał powstaje w warunkach naturalnej przyrody, czego dowodem jest ich obecność w Tabelach 14 i 17 w materiałach pochodzenia naturalnego (skorupy kurcze, czy kości wieprzowe).

### 3) Uwaga do rysunku 28.

Wyniki na rys 28 pokazują duży rozrzut stosunków molowych Ca/P w próbkach otrzymanych po hydrolizie białkowej 100 gramów szlamu kostnego traktowanego zmienną ilością kwasu mlekowego a następnie kalcynowanego w różnych temperaturach. Nie zaobserwowano przy tym kierunku zmian stosunku molowego Ca/P w zależności od temperatury kalcynowania. Ten rozrzut wyników doktorantka próbuje tłumaczyć zmiennością składu fazowego w poszczególnych próbkach w obrębie badanej serii. Rzeczywiście, skład fazowy finalnego produktu po hydrolizie masy kostnej i kalcynacji się zmienia, co pokazują dyfraktogramy na Rys 26. Na dyfraktogramie widoczne jest przegrupowanie proporcji poszczególnych rodzajów fosforanów wapnia w miarę podwyższania temperatury kalcynacji.

Należy mieć jednak na uwadze to, że w każdym otrzymanym produkcie, źródłem fosforanów wapnia jest wyłącznie 100 gramów wyjściowego szlamu kostnego, w którym wyjściowy stosunek molowy Ca/P ma określoną wartość. Niezależnie od dalszych przemian fizycznych i chemicznych podczas procesu hydrolizy w kwasie mlekowym i kalcynowania w coraz to wyższych temperaturach, nie należy chyba spodziewać się powstawania lotnych związków wapnia czy fosforu, które mogłyby opuścić ten układ i zachwiać stosunkiem molowym Ca/P ??? Raczej nie. Może zachwiać jedynie wartościami wyrażonymi w procentach wagowych danej próby na skutek wydzielenia pary wodnej, czy dwutlenku węgla.

Reasumując ten akapit, odnoszący się do Rysunku 28, znaczące zmienności molowego stosunku Ca/P po hydrolizie szlamów kostnych, traktowanych kwasem mlekowym i kalcynacji w różnych temperaturach raczej nie da się tłumaczyć, jak sugeruje doktorantka zmieniającym się składem fazowym, który faktycznie ma miejsce w poszczególnych próbkach w obrębie serii badanej. Ten rozrzut wyników analizy może zdaniem recenzenta tkwić raczej w technice analitycznej.

Z własnego wieloletniego doświadczenia pracy w laboratorium mogę stwierdzić, że znane mi są problemy towarzyszące ilościowej analizie tych właśnie pierwiastków w układach chemicznie złożonych nawet przy zastosowaniu nowoczesnej aparatury

analitycznej, zwłaszcza gdy pierwiastkom Ca i P towarzyszą inne, obce metale, co w danym przypadku ma miejsce, sądząc po ich obecności, choć niewielkich ich ilości, ale jednak metali zawartych w tabeli 17.

**Dlatego też nie czynię doktorantce zarzutu z wyników przedstawionych na rysunku 28.** Zwracam jedynie uwagę na problemy analizy chemicznej pierwiastków, rzutujące często na wynik i późniejszą ich interpretację.

Kończąc ten rozdział interesującym punktem odniesienia do rysunku 26 mógłby być dyfraktogram kalcynowanego w temperaturze rzędu 1000° C szlamu kostnego nietraktowanego kwasem mlekowym. Czy taka czynność laboratoryjna miała miejsce? I czy wynik byłby interesujący?

#### 4) Tworzenie materiałów kompozytowych.

Mając dokładnie opracowany i opisany wyżej składnik mineralny w postaci proszku hydroksyapatytowego, przyszłego komponenta kompozytu organiczno-mineralnego doktorantka wykonywała równoległe badania nad wytworzeniem osnowy polimerowej dla przyszłego kompozytu .

Najpierw wykonała szereg badań wstępnych nad przygotowaniem ciekłego medium organicznego w różnych proporcjach podstawowych składników PVP/Żelatyna w oparciu o charakterystykę jego lepkości. Na tej podstawie wyselekcjonowała do dalszych badań 3 zestawy złożone ze składników, którymi były: 15 procentowy PVP i 2% Gel różniące się stosunkiem objętościowym PVP/Gel = 1/1; PVP/Gel = 1/3 i PVP/Gel = 3/1 jako odpowiednie układy do dalszych badań.

Wybrane układy PVP/Gel poddała sieciowaniu stosując PEGDA (diakrylan poli(glikolu etylenowego), jako czynnik sieciujący oraz 2-hydroksy-2-metylopropiofenon (Darocur 1173) w charakterze inicjatora oraz promieniowanie UV.

Gęstość usieciowania szacowała badając chłonność materiałów poprzez pęcznienie ich w roztworach soli fizjologicznej buforowanej PBS o pH = 7.4 w funkcji czasu, zmiennej ilości czynnika sieciującego (Rys 32A) i zmiennej ilości fotoinicjatora (Rys 32B, i Rys 40).

Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka wyselekcjonowała najbardziej odpowiedni skład mieszaniny reakcyjnej dla tworzenia matrycy polimerowej.

Na podstawie analizy widm FTIR doktorantka wnioskuje, że sieciowanie układu zawierającego PVP i żelatynę w sieci PEGDA jest procesem fizycznym, a powstające oddziaływania międzycząsteczkowe mają charakter wiązań wodorowych, tworząc wzajemnie przenikające się sieci polimerowe.

Otrzymała trwałe struktury polimerowe o gęstym upakowaniu łańcuchów , co zapewniało materiałom odpowiednią wytrzymałość mechaniczną.

Badanie kinetyki chłonności soli fizjologicznej wskazuje dość wyraźnie, że chociaż końcowy efekt pęcznienia matryc i kompozytów jest na podobnym poziomie, to jednak szybkość dochodzenia do tego poziomu jest różna, a mianowicie, kompozyt w porównaniu z matrycą szybciej wchłania roztwór soli fizjologicznej i szybciej dochodzi do końcowego poziomu nasycenia roztworem. To oznacza, że wprowadzenie fazy ceramicznej do polimeru zwiększa zdolność wnikania cząsteczek wody do struktury polimerowego kompozytu.

Może jest za wcześnie, ale nasuwa się pytanie, czy zwiększenie chłonności roztworu jest spowodowane zjawiskiem chemicznym, wynikającym z natury wprowadzonego mineralnego wypełniacza, czy fizycznym polegającym na „rozpychaniu” sieci polimerowej przez ziarna tego wypełniacza?

## Podsumowanie

Recenzowana praca doktorska zawiera ogromny materiał doświadczalny.

Na tle ilości otrzymanych wyników i ich szerokiej dyskusji, jaką doktorantka prowadziła w poszczególnych rozdziałach recenzowanej pracy, podsumowujące wnioski wydają się być dość skromnie zredagowane. Szereg interesujących wyników nie znalazło we wnioskach odzwierciedlenia.

Na podkreślenie jednak zasługuje ogrom wykonanych badań. Na recenzowaną pracę złożyły się 2 technologie, opracowane w skali laboratoryjnej. Obejmują one: 1) wytworzenie HAP ze skorupy kurzych jaj lub z kości wieprzowych, 2) wytworzenie materiału kompozytowego nieorganiczno-organicznego, w którym sieć polimerowa, pełniąca funkcję osnowy organicznej została wypełniona bioaktywnym fosforanem wapnia o strukturze apatytu.

Materiał otrzymany jest w zamyśle syntetycznym odpowiednikiem naturalnej tkanki kostnej, w której sieć, zbudowana z włóknistej tkanki kolagenowej, jest „zacementowana” fosforanem wapnia o strukturze apatytowej. W materiale syntetycznym, wyprodukowanym przez doktorantkę, rolę kolagenu przeniesiono na polimer.

Wyniki badań tej pracy rozszerzają wiedzę o technologii i właściwościach materiałów biozgodnych – bioaktywnych o potencjale rokującym zastosowanie go jako substytut tkanki kostnej.

Niezależnie od pewnych usterek przy redagowaniu pracy, doktorantka wykazała się

- a) umiejętnością wykorzystania współcześnie dostępnych metod badawczych do interpretacji zmian składu chemicznego i fazowego zachodzących w strukturze ciała stałego oraz
- b) umiejętnością prowadzenia dyskusji uzyskiwanych doświadczalnie wyników na tle dostępnej literatury.

Reasumując, mimo pewnych usterek, zauważonych podczas redagowania pracy, do czego początkujący naukowiec powinien mieć prawo, stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału o potraktowanie jej jako pracę wyróżniającą się.

Przedstawiona do recenzji **praca spełnia warunki określone w art.13 z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym stawiane pracom doktorskim i wnoszę i dopuszczam mgr inż. Klaudię PLUTĘ do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

