



Zachodniopomorski
Uniwersytet
Technologiczny
w Szczecinie



Katedra
Inżynierii Polimerów
i Biomateriałów

Al. Piastów 45, 71-311 Szczecin

prof. dr hab. inż. Mirosława El Fray

tel: (+48) 91 499 48 28

fax: (+48) 91 499 40 98

Email: mirfray@zut.edu.pl

Ocena pracy doktorskiej Pani **mgr inż. Moniki Budnickiej**

pt.: **„Otrzymywanie i charakteryzacja rusztowań z polilaktydu do regeneracji kości gąbczastej”**

przedstawionej do obrony na Wydziale Chemicznym
Politechniki Warszawskiej

Promotor: prof. dr hab. inż. Ludwik Synoradzki

Promotor pomocniczy: dr inż. Agnieszka Gadomska-Gajadhur

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 197 stron maszynopisu, w tym 108 rysunków i 23 tabele oraz spis symboli i skrótów. W pracy cytowano 239 pozycji literaturowych. Praca podzielona jest na 12 rozdziałów uzupełnionych o informację o dorobku naukowym Doktorantki.

Ocenę merytoryczną i naukową pracy pragnę przedstawić w następujących punktach.

1. Aktualność tematu
2. Elementy nowości w pracy
3. Analiza doboru technik eksperymentalnych i metodyk badawczych
4. Uwagi dyskusyjne
5. Wnioski końcowe

Aktualność tematu pracy

Inżynieria tkankowa stanowi obecnie jedną z najbardziej zaawansowanych dziedzin nauki ukierunkowanych na wytwarzanie substytutów tkankowych z wykorzystaniem najczęściej polimerów syntetycznych lub naturalnego pochodzenia oraz komórek własnych pacjenta. Rozwijana w laboratoriach badawczych od zaledwie kilku dekad, doczekała się już wprowadzonych na rynek wyrobów medycznych, takich jak sztuczna skóra czy sztuczna kość. W tym ostatnim obszarze obserwuje się niezwykle dynamiczny rozwój, głównie pod kątem doboru materiałów, które spełniłyby wymagania związane z nie tylko z ich biogodnością, osteokonduktywnością, kontrolowaną biodegradacją i porowatością ale również odpowiednimi właściwościami mechanicznymi dopasowanymi do właściwości tkanki kostnej. Doktorantka na podstawie dokonanego przeglądu literatury wskazała, że największy potencjał w sprośaniu tym wymaganiom mogą spełnić odpowiednio połączone ze sobą polimery syntetyczne, takie jak poli(l-laktyd) (PLLA) czy kopolimery kwasu metakrylowego oraz polimery naturalne, m.in. chitozan i alginian wapnia. Analiza literatury przeprowadzona przez Doktorantkę wykazała również, że kluczową rolę w regeneracji tkanki odgrywają bioaktywne molekuly, głównie proteiny i peptydy. Naturalną strukturę kości gąbczastej można odtworzyć poprzez wytworzenie porowatych skafoldów z wykorzystaniem metod, spośród których Autorka jako najważniejsze uważa inwersję faz, elektroprzędzenie, ługowanie czy spienianie gazem. Doktorantka stwierdziła również, że kluczowym czynnikiem decydującym o oddziaływaniach na styku: biomateriał-tkanka są właściwości powierzchniowe skafoldów, których uzyskanie zapewniają różne metody modyfikacji warstwy wierzchniej. Gruntowny przegląd literatury pozwolił Doktorantce porównać wady i zalety najpopularniejszych metod modyfikacji powierzchni materiałów w celu nadania im bioaktywności, w tym przede wszystkim osteoindukcyjności. Na podstawie tak gruntownie dokonanego przeglądu literatury zawartego na 30 stronach, Doktoranta sformułowała cel pracy jakim było opracowanie przestrzennego (trójwymiarowego) substytutu kości gąbczastej o zdefiniowanych właściwościach, w tym biogodności, mikro- i makroporowatości oraz odpowiedniej elastyczności, który można przesączać osoczem bogatopłytkowym w celu uzyskania zdolności do pobudzania mineralizacji kości. Aktualność tematyki pracy, ze względu na potencjalne wykorzystanie w regeneracji kości, jest bezdyskusyjna.

Elementy nowości w pracy

W literaturze można znaleźć przykłady różnych materiałów i metod ich wytwarzania w celu uzyskania substytutów kości. Choć PLLA jest polimerem powszechnie stosowanym do wytwarzania różnych wyrobów medycznych, zwłaszcza w implantach kości ze względu na dobre właściwości osteokondukcyjne, to zastosowanie osocza bogato płytkowego w celu nadania implantom cech osteoindukcyjnych jest oryginalnym pomysłem Doktorantki. Poprzez osadzanie fosforanów wapnia różnymi metodami, Doktorantka zaplanowała uzyskanie efektu poprawionej zwilżalności powierzchni materiałów, a w efekcie, biozgodności i bioaktywności. Wytwarzanie struktur przestrzennych z PLLA jako substytutów kości i ich modyfikacja poprzez dodatek kopolimerów kwasu metakrylowego na etapie wytwarzania, nanoszenie na gotowe struktury przestrzenne polimerów naturalnych oraz powłok fosforanowo-wapniowych stanowią o nowości pracy, co zostało udokumentowane trzema zgłoszeniami patentowymi.

Autorka wykazała, że zastosowanie metody ekstrakcji rozpuszczalnika z wymrażaniem (*freeze-extraction*) pozwala na otrzymanie struktur przestrzennych o wielkości porów dopasowanych do rozmiaru komórek tkanki kostnej. Dzięki zastosowaniu kopolimeru kwasu metakrylowego do modyfikacji PLLA oraz metanolu jako porofora, Doktorantka otrzymała materiały charakteryzujące się wysoką nasiąkliwością masową dzięki wysokiej porowatości. Wykorzystanie polimerów naturalnych, m.in. alginianu sodu i chotozanu oraz ich mieszanin do modyfikacji powierzchni struktur z PLLA pozwoliło na uzyskanie zadowalających wyników badań cytotoxyczności *in vitro*. Doktorantka wykazała, że uzyskanie bioaktywnej powłoki w całej objętości struktur przestrzennych było możliwe dzięki biomimetycznemu osadzeniu fosforanów wapnia na powierzchni skafoldów wstępnie zhydrofilizowanych etanolem. Dzięki zastosowaniu wirowania podczas nasączania struktur przestrzennych osoczem uzyskano polepszenie nasiąkliwości w porównaniu do procesu statycznego. Efekt ten uległ poprawie stosując modyfikację powierzchni struktur przestrzennych fosforanami wapnia. Co istotne, wprowadzanie osocza do tak zmodyfikowanych skafoldów było możliwe również podczas stosowania warunków statycznych. Doktorantka wykazała, że tak zmodyfikowane skafoldy z PLLA wykazują największą bioaktywność w teście biomimeryzacji *in vitro*, wskazując tym samym na wysoki potencjał w procesie mineralizacji tkanki kostnej.

Analiza doboru technik eksperymentalnych i metodyk badawczych

Zgodnie z opisem zawartym w rozdziale 9, Doktorantka zastosowała szereg nowoczesnych metod badawczych i analitycznych do scharakteryzowania struktury i właściwości wytworzonych materiałów polimerowych, m.in. spektroskopię w podczerwieni, spektrometrię ICP-OES, chromatografię żelową czy skaningową mikroskopię elektronową z analizą EDS. Metody mikroskopowe, w tym skaningowej mikroskopii elektronowej z rozpraszaniem energii, pozwoliły na zbadanie morfologii i ocenę topografii powierzchni struktur przestrzennych. Zastosowanie metody statycznego ściskania pozwoliło na wyznaczenie modułu Young'a wytworzonych struktur, a miareczkowanie wolumetryczne Kara-Fischera dostarczyło informacji o zawartości wody. Zastosowane metody badawcze, w szczególności analiza EDS, pozwoliły Doktorantce wykazać efektywność procesu nasączenia porowatych materiałów osoczem, co stanowiło jeden z kluczowych elementów bardzo szerokiego planu preparatywnego nad otrzymywaniem struktur o potencjalnej skuteczności kościotwórczej *in vivo*. Skuteczność opracowanej metody modyfikacji polilaktydowych struktur przestrzennych fosforanami wapnia została potwierdzona metodami spektroskopowymi, analizą pierwiastkową i w testach komórkowych.

Podsumowując, należy stwierdzić, że zastosowane techniki eksperymentalne i metody badawcze zostały dobrane w sposób trafny i odzwierciedlający eksperymentatorski charakter pracy doktorskiej.

Uwagi dyskusyjne

W pracy poruszono szereg zagadnień związanych z wytwarzaniem i charakterystyką porowatych struktur przestrzennych z poli(l-laktydu) i jego różnych modyfikacji w celu wytworzenia materiałów o potencjalnym zastosowaniu w regeneracji kości. Zbadane właściwości skorelowano z rodzajem porofora używanego do procesu wytwarzania struktur, stężeniem roztworów polimerów wykorzystywanych do preparatyki materiałów czy sposobem oczyszczania finalnych produktów. Praca zawiera olbrzymi materiał doświadczalny, dobrze i logicznie opracowany. Niedosyt budzi brak postawionej hipotezy badawczej i rozważań natury poznawczej.

Dyskusja wyników i wnioski są dobrze sformułowane i w pełni odzwierciedlają bogactwo wyników z prac preparatywno-eksperymentalnych zawartych w pracy. Niektóre z nich zostały zawarte w publikacjach, zgłoszeniach patentowych i materiałach konferencyjnych.

Doktorantka zaprojektowała materiał do rekonstrukcji ubytków kostnych i nasiąkliwość struktur przestrzennych analizowała dla próbek o geometrii walców o średnicy 25 mm i podobnej (lub większej) wysokości. Czy wytworzone materiały mogą nadawać się do rekonstrukcji dużych ubytków (tzw. *critical-size defects*), gdzie ważne jest przenoszenie naprężeń, skoro właściwości mechaniczne zostały zweryfikowane na niestandardowych kształtkach?

Doktorantka wykorzystywała do badań komórkowych ekstrakty przygotowane z porowatych próbek o wymiarach 25 mm x 1 mm. Jaki ewentualny wpływ miały różnice w porowatości próbek na wyniki testów, skoro norma zaleca wykonanie testów na materiałach o zdefiniowanej powierzchni?

Podsumowując stwierdzam, że nie wnoszę zasadniczych uwag do interpretacji wyników i sposobu przeprowadzenia badań. Przedstawione uwagi o charakterze dyskusyjnym nie umniejszają w sposób znaczący wartości pracy.

Wnioski końcowe

Doktorantka zrealizowała bardzo obszerny program badań eksperymentalnych, uzyskując interesujące wyniki o niepodważalnych znamionach nowości naukowej. Praca wnosi cenny wkład w poznanie właściwości nowych struktur przestrzennych wytworzonych oryginalną techniką *freeze-extraction* i poddanych różnym modyfikacjom w celu wytworzenia materiałów o potencjalnym zastosowaniu jako implanty kostne. Doktorantka znacząco poszerzyła wiedzę na temat wpływu parametrów wytwarzania i modyfikacji struktur przestrzennych z poli(l-laktydu) na ich morfologię, właściwości sorpcyjne, mechaniczne i biologiczne w warunkach *in vitro*.

Biorąc pod uwagę osiągnięte wyniki, stwierdzam iż przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Moniki Budnickiej spełnia warunki przewidziane ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 192 ust. 2, Dz.U. poz. 1668, z późn. zm.) oraz art. 180 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. poz. 1669, z późn. zm.). Dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Budnickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.


Mirosława El Fray

Szczecin, 1.10.2020 r.