



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsfelda

Polskiej Akademii Nauk

Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący

Centrum Doskonałości: IMMUNE

dr hab. Jacek Rybka, prof. PAN

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

im. Ludwika Hirsfelda we Wrocławiu

ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław

email: rybka@iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 18 października 2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Osękowskiej:
„Ocena biologiczna nanokrystalicznych cienkich warstw na bazie miedzi i tytanu”**

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Rybak

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Damian Wojcieszak

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi kontynuację szeroko zakrojonych badań, prowadzonych przez zespoły Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Politechniki Wrocławskiej oraz Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, dotyczących poszukiwania biomateriałów o nowych właściwościach biologicznych. Interdyscyplinarna praca mgr Małgorzaty Osękowskiej dotyczy analizy właściwości szeregu nanomateriałów cienkowarstwowych, tworzonych poprzez napyłanie magnetronowe powierzchni za pomocą miedzi i tytanu. Praca obejmowała zarówno analizę fizykochemiczną uzyskanych materiałów jak i badanie ich aktywności biologicznej wobec bakterii i komórek eukariotycznych.

Nowoczesne nanokrystaliczne materiały cienkowarstwowe są obiecującym rozwiązaniem dla tworzenia nietoksycznych pokryć implantów lub urządzeń przeznaczonych do bezpośredniego kontaktu z żywą tkanką. Wraz z rozwojem wiedzy dotyczącej biomateriałów, oprócz nietoksyczności ważne stało się także uzyskiwanie biokompatybilności oraz działania przeciwbakteryjnego, z uwagi na możliwość występowania przewlekłych zakażeń bakteryjnych wywoływanych przez implantowane materiały i urządzenia.

Rozprawa mgr Małgorzaty Osękowskiej składa się ze wstępu wprowadzającego w tematykę pracy, celu pracy, części metodycznej „Materiały i Metody”, wyników, dyskusji oraz wniosków; do rozprawy dołączono także streszczenia w języku polskim i angielskim, spis ważniejszych oznaczeń i akronimów, zestawienie cytowanej literatury oraz spis dotychczasowego dorobku naukowego doktorantki.



Praca zawiera 131 stron maszynopisu, liczne rysunki, schematy, wykresy i tabele. W obszernym i czytelnie napisanym wstępie przedstawiono pokrótce najważniejsze informacje dotyczące właściwości biologicznych tytanu i miedzi, porównanie właściwości biomateriałów na bazie miedzi i tytanu, zjawiska przypowierzchniowe podczas kontaktu tych materiałów ze środowiskiem biologicznym oraz omówiono skrótowo mechanizmy toksyczności miedzi.

Cele pracy zostały jasno sformułowane. Zasadniczym zadaniem było kompleksowe fizykochemiczne i biologiczne zbadanie uzyskiwanych biologicznych nanomateriałów, z dostosowaniem istniejącej metodyki do przeprowadzenia tych badań i wyodrębnieniem materiałów charakteryzujących się skuteczną aktywnością przeciwbakteryjną przy jednoczesnym braku toksyczności wobec komórek eukariotycznych.

W części metodycznej „Materiały i Metody” omówiono metodę rozpylania magnetronowego, z wykorzystaniem której uzyskiwano badane biomateriały, przedstawiono stosowane techniki pomiarowe, metody pomiaru aktywności antybakteryjnej, cytotoksycznej (testami MTT i klonogennym), stopnia apoptozy oraz faz cyklu komórkowego.

W części doświadczalnej zaprezentowano wyniki badań fizykochemicznych uzyskanych nanomateriałów cienkowarstwowych: analizę struktury materiałów wykonanych za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) ze spektroskopią dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS), dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD), rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS), atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) czy kąta zwilżania. Badano trzy typy uzyskanych cienkich warstw Cu:Ti: Cu₈₃Ti₁₇, Cu₅₃Ti₄₇, Cu₂₅Ti₇₅ o zawartości Cu odpowiednio 83%, 53% i 25%.

Jednocześnie nanomateriały badano także pod kątem biologicznym. Testowano aktywność biologiczną materiałów w kontakcie z wybranymi szczepami bakterii oraz ich cytotoksyczność. Testy bakteriobójczości prowadzono na dwu szczepach bakteryjnych: *E. coli* PCM 1144 (bakterie Gram-ujemne) oraz *Staphylococcus aureus* PCM 2602 (bakterie Gram-dodatnie). W testach z komórkami eukariotycznymi wykorzystywano komórki mysich fibroblastów: linii L929 oraz linii pierwotnej Balb/C. Badano zmiany morfologiczne komórek pod wpływem bezpośredniego kontaktu z badanymi nanomateriałami, zdolność do proliferacji, aktywność metaboliczną a także reakcję komórek na kontakt z nadsącem znanym z badanego biomateriału, zwanego przez Autorkę „wyciągiem”.

Przedstawione wyniki analizy fizykochemicznej materiałów dotyczące badania składu materiałów metodą EDS (spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego), wykazały, że trzy typy badanych cienkich warstw Cu:Ti miały skład: Cu₈₃Ti₁₇, Cu₅₃Ti₄₇, Cu₂₅Ti₇₅ (zawartości Cu odpowiednio 83%, 53% i 25%). Badanie materiałów za pomocą

elektronowej mikroskopii skaningowej wykazało różnice w typie struktury i powierzchni poszczególnych materiałów. Podczas gdy struktura otrzymanego materiału miała postać ziarnistą dla Ti i kolumnową dla Cu, dla materiałów zawierających zarówno Ti jak i Cu, postać kolumnowa była wyraźniejsza dla materiałów zawierających więcej Cu. Wykazano także różnorodność stopnia rozwinięcia powierzchni materiału: chropowatość powierzchni wytworzonych powłok była najmniejsza dla materiału $\text{Cu}_{53}\text{Ti}_{47}$. Z kolei za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej pokazano nanokrystaliczną strukturę wszystkich badanych materiałów, o mieszanym składzie kryształów Cu oraz Cu_4Ti_3 . Analiza materiału za pomocą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS) pozwoliła uwidocznić obecność zarówno miedzi jak i tytanu w postaci utlenionej: Cu^{1+} , Cu^{2+} oraz Ti^{+4} i małą ilość jonów Ti^{3+} . Badanie stopnia dyfuzji jonów miedzi z materiału do podłoża wykazało, że o ile z materiału $\text{Cu}_{83}\text{Ti}_{17}$ stopień dyfuzji był podobny do dyfuzji z czystej miedzi o tyle dla materiałów o zawartości miedzi 53% i 25% wartość ta drastycznie maleje.

Analiza aktywności przeciwbakteryjnej badanych materiałów wykazała korelację tej aktywności z zawartością Cu w materiale, zarówno w stosunku do bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*), jak i Gram-dodatnich (*S. aureus*).

Badanie toksyczności materiałów w stosunku do komórek eukariotycznych prowadzono metodą pośrednią: przez wyciągów danych materiałów jak i poprzez obserwację reakcji komórek na bezpośredni kontakt z badanym materiałem. Zarówno analiza mikroskopowa morfologii komórek, badania za pomocą testu klonogenego czy aktywności metabolicznej komórek, wykazały wyraźne zmniejszenie wpływu cytotoksycznego dla materiałów o zawartości miedzi poniżej 53%. Dodatkowe badania dyfuzji jonów miedzi z materiału do środowiska oraz badania cytofluorymetryczne faz wzrostu komórki i śmierci komórkowej potwierdziły, że najbardziej obiecującym z badanych materiałów jest $\text{Cu}_{25}\text{Ti}_{75}$, z uwagi na jego działanie przeciwbakteryjne przy jednoczesnym braku toksyczności wobec badanych komórek eukariotycznych.

W interesującej i szczegółowej dyskusji podsumowano uzyskane wyniki i przedstawiono je na tle danych literaturowych. W sumie, w całej pracy Autorka cytuje 228 pozycji piśmiennictwa zarówno z ostatnich lat jak i wcześniejszych, co świadczy o dogłębnej analizie dostępnej literatury tematu przez Doktorantkę.

Uwagi merytoryczne do przedstawionej pracy są nieliczne. Autorka wspomina w części „Cel pracy”, że model badawczy został dobrany na podstawie analiz właściwości serii powłok Cu-Ti o różnej proporcji metali w nanomateriale. W pracy przedstawiono wyniki dotyczące

trzech typów nanomateriałów, interesujące byłoby podanie skrótowej informacji dotyczącej uzyskanych wyników również dla materiałów o innym składzie Cu:Ti.

Wg mnie wartości kątów zwilżania podane na str. 50 nie korelują z przedstawionym kształtem kropli formowanej na danym materiale (np. dla materiału $\text{Cu}_{83}\text{Ti}_{17}$, gdzie kształt kropli jest bardzo zbliżony do kropli na Cu czy Ti, natomiast wyliczony kąt zwilżania zbliżony do materiału $\text{Cu}_{25}\text{Ti}_{75}$, czy bardzo zbliżone wyliczone wartości kąta zwilżania dla $\text{Cu}_{53}\text{Ti}_{47}$ i Ti przy bardzo różnych kształtach formowanej kropli). Kształt przedstawionych kropli na poszczególnych materiałach sugerowałby największą hydrofobowość dla materiału $\text{Cu}_{53}\text{Ti}_{47}$, co korelowałoby z danymi dotyczącymi mikrochropowatości uzyskanymi dzięki mikroskopii SEM, jednak dane liczbowe tego nie potwierdzają.

Określenie „wyciąg”, którym Autorka określa płyn hodowlany w którym inkubowano badane biomateriały do analizy wpływu dyfundujących jonów metali na komórki eukariotyczne uważam za niezbyt trafny. Słowo wyciąg kojarzyłbym raczej z wybiórczą ekstrakcją złożonego materiału organicznego, podczas gdy w tym przypadku mamy raczej do czynienia z dyfuzją jonów miedzi i tytanu z materiału nieorganicznego o stosunkowo prostym składzie do środowiska.

Moją drobną uwagą, dotyczącą układu pracy, jest wyraźny brak omówienia części stosowanych fizykochemicznych technik pomiarowych w rozdziale „Materiały i Metody”, dotyczy to dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD), rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS), atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) czy kąta zwilżania. Skrótowe omówienie tych technik i sposobów ich interpretacji w rozdziale „Materiały i Metody” z pewnością ułatwiłoby osobom nie posiadającym wiedzy fachowej właściwą ocenę uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Dodatkowa uwagą formalną jest nietypowy podział wyników i opisów doświadczeń pomiędzy poszczególne rozdziały: umieszczenie opisu części doświadczalnej i wyników atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS), wpływu migracji jonów miedzi na przeżywalność komórek i wyników analizy cytofluorymetrycznej komórek nie w części „Wyniki” a w rozdziale „Dyskusja i analiza odpowiedzi biologicznej w powiązaniu z wybranymi właściwościami cienkich warstw na bazie miedzi i tytanu”, z kolei wyniki badania składu materiałów metodą EDS (spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego) podano w części Materiały i Metody; taki sposób przedstawiania uzyskanych wyników nieco utrudnia ocenę całości zakresu przeprowadzonych badań. Uwagi te nie wpływają jednak na ogólną, pozytywną ocenę rozprawy.

W podsumowaniu należy podkreślić, że praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane, zastosowana metodyka odpowiada założonemu

celowi pracy a uzyskane wyniki są interesujące i dostarczają szeregu danych dotyczących możliwości zastosowania biomateriałów na bazie miedzi i tytanu do zastosowań biomedycznych. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są ciekawe, o dużym potencjale rozwojowym i praktycznym. Pokazują one możliwość wykorzystania badanych substancji jako możliwych materiałów dla pokrywania implantów chirurgicznych bądź innych urządzeń wszczepianych do organizmu. Praca ma także walor interdyscyplinarności, udanie łącząc zagadnienia zaawansowanej analityki chemicznej i materiałowej oraz techniki mikrobiologiczne oraz biologii komórki.

Nie mam znaczących uwag krytycznych do pracy, błędy literowe oraz stylistyczne są nieliczne, tytuł jest zgodny z treścią rozprawy. Uzyskane wyniki zostały opisane szczegółowo i dobrze udokumentowane na wykresach i rycinach. Należy wysoko ocenić przedstawiony dorobek naukowy Autorki, na który składa się siedem publikacji, w 3 pracach była Ona pierwszym autorem, 4 prace opublikowano w czasopismach z listy filadelfijskiej (współczynnik wpływu odpowiednio 3,387; 3,420; 0,610, 0,575), a także ośmiu doniesień konferencyjnych na konferencjach międzynarodowych i 35 doniesień na konferencjach krajowych, z wymienionymi czterema wyróżnieniami i nagrodami, co dobrze wyraża również rozwój naukowy Doktorantki.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Osękowskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wniosuję tym samym do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Małgorzaty Osękowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'P. Rybka', is written in a cursive style.