

Dr hab. Albert Czerski

Wrocław, 23 sierpnia 2018 r.

Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt

Zakład Fizjologii Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani magister Małgorzaty Osękowskiej
pt. „Ocena biologiczna nanokrystalicznych cienkich warstw na bazie miedzi i tytanu”**

wykonanej na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem promotora Pana prof. dra hab. Zbigniewa Rybaka i promotora pomocniczego dr hab. inż. Damiana Wojcieszaka.

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 21 czerwca 2018 roku (nr uchwały 432/06/2018).

Rozprawa doktorska finansowana była ze środków grantu dla młodych naukowców Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz częściowo finansowana w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki.

Doktorantka w dysertacji podjęła tematykę wykorzystania biomateriałów w medycynie. Temat ten jest aktualny i bardzo istotny dla rozwoju medycyny regeneracyjnej, która to w dobie starzejącego się społeczeństwa odgrywa coraz to większą rolę. Biomateriał, to każda substancja inna niż lek albo kombinacja substancji pochodzenia syntetycznego lub naturalnego, która może być użyta w dowolnym czasie, w celu czasowego lub permanentnego uzupełnienia tkanek lub ich części i przejęcia ich funkcji. Doktorantka w dysertacji zajęła się biomateriałami metalicznymi, w których wykorzystywane są stopy tytanu, kobaltu, stali austenitycznej oraz stopy z pamięcią kształtu. Biomateriał narażony jest na działanie jonów potasu, sodu, chloru, wapnia i magnezu oraz na procesy zużycia związane ze zmiennymi obciążeniami. Głównymi założeniami w tworzeniu biomateriałów jest utrzymanie równowagi pomiędzy właściwościami fizycznymi materiału a oddziaływaniem toksycznym na komórki gospodarza.

Rozprawa doktorska ma typowy układ. Składa się ze: spisu treści, wstępu, założeń i celu pracy, materiału i metod, wyników, dyskusji, wniosków, streszczeń w języku polskim i angielskim, spisu ważniejszych oznaczeń i akronimów, bibliografii oraz dodatkowo został przedstawiony dorobek naukowego autora dysertacji. Całość pracy zawarta jest na 131

stronach druku. Warto podkreślić w ocenie, co też czynię, że Pani magister Małgorzata Osękowska posiada duży dorobek naukowy, który wypracowała przed uzyskaniem tytułu doktora. Składa się on z 7 prac naukowych, 8 doniesień na konferencjach międzynarodowych oraz aż 35 doniesień na konferencjach krajowych. Sumaryczny impact factor dorobku to 7,99 i pkt. MNiSW/KBN: 96.

We wstępie dysertacji doktorantka opisuje właściwości biomateriałów używanych w medycynie, ze szczególnym nakreśleniem właściwości tytanu i miedzi. Opisuje istotne właściwości tych metali dla oddziaływań biologicznych porównując je między sobą oraz opisuje procesy wchłaniania miedzi. Poświęca też uwagę zagadnieniom związanym ze zjawiskami zachodzącymi na styku materiału ze środowiskiem biologicznym. Powierzchnia biomateriałów i jej cechy fizyko-chemiczne są najistotniejsze w interakcji z żywymi tkankami. Na stronie 18. doktorantka przedstawiła zestawienie poszukiwanych cech biomateriałów do ich właściwości biofunkcjonalnych, co w sposób przejrzysty i kompleksowy przedstawia rycina 1.9. Istotnym zjawiskiem wpływającym na biokompatybilność biomateriału w organizmie jest adhezja komórek do powierzchni materiału. Zależy ona od wytworzenia grup funkcyjnych. Z kolei rodzaj grup funkcyjnych na powierzchni wpływa na zwilżalność materiału. We wstępie dysertacji szczegółowo doktorantka opisuje interakcje materiału z tkanką, uwzględniając poszczególne etapy wganiania się materiału w tkankę okoliczną. Wstęp pracy jest wyczerpujący i pozwala zapoznać się z zagadnieniami omawianymi w dysertacji. Na koniec wstępu doktorantka podsumowuje całość pracy w formie krótkiego omówienia tematyki rozdziałów. Podsumowanie umieszczone jest w podrozdziale 1.4.1 pod tytułem „Cytotoksyczność miedzi”. Wydaje się że, lepiej wprowadzić dodatkowy podrozdział 1.5. pod tytułem „Podsumowanie” lub „Układ pracy” i zacząć od nowej strony. Pozwoliłoby to oddzielić od siebie te dwa różne tematy.

Drugi rozdział to założenia i cel pracy. Pani mgr Małgorzata Osękowska postawiła sobie w pracy następujące cele badawcze:

1. Opracowanie metodyki zintegrowanego badania właściwości fizyko-chemicznych, bakteriobójczych i cytotoksycznych nanomateriałów cienkowarstwowych;
2. Powiązanie bakteriobójczości i cytotoksyczności nanokrystalicznych cienkich warstw Cu-Ti z ich właściwościami fizyko-chemicznymi: strukturą powierzchni, stosunkiem zawartości miedzi i tytanu, emisją jonów oraz stopniem utlenienia miedzi.

3. Ustalenie optymalnych proporcji miedzi do tytanu w cienkich warstwach, wykazujących najwyższą skuteczność przeciwbakteryjną przy zachowaniu braku toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych.

W rozdziale „Cele” doktorantka zgrabnie, w kilku zdaniach podsumowuje założenia badawcze jakie sobie postawiła w dysertacji, wraz z badaniami jakie wykorzystwała.

W rozdziale „Materiał i metody” Pani magister Małgorzata Osękowska opisała sposób wytwarzania cienkich warstw na bazie miedzi i tytanu metodą rozpylania magnetronowego. Podrozdział opisujący to zagadnienie jest zwięzły i w prosty sposób przedstawia zagadnienie, a liczne zdjęcia i ryciny dodatkowo ułatwiają zrozumienie procesu wytwarzania powłok cienkowarstwowych. Cienkie warstwy na bazie miedzi i tytanu zostały wytworzone w Wydziałowym Zakładzie Technologii Próżniowych i Diagnostyki Nanomateriałów na Wydziale Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej. W kolejnych podrozdziałach doktorantka przedstawiła metodologię badania poziomu aktywności antydrobnoustrojowej oraz cytotoksyczności warstw przy użyciu mysich fibroblastów. Zagadnienie to szczegółowo zostało omówione, a rozbieżność tematu na szereg podrozdziałów umożliwia łatwe zrozumienie warsztatu badawczego jakim posługiwała się doktorantka w swojej dysertacji. Dobór metod badawczych jest prawidłowy, zgodny z celami jakie zostały postawione w pracy i normami ISO.

Rozdział wyniki jest bardzo obszerny i zajmuje aż 41 stron. W tej części doktorantka szczegółowo opisała i bogato zilustrowała uzyskane w dysertacji wyniki swoich obserwacji. W podrozdziale 4.1. Pani magister Małgorzata Osękowska opisała wyniki badań właściwości strukturalnych i powierzchni cienkich warstw na bazie miedzi oraz tytanu. Podrozdział zawiera liczne rysunki z elektronowego mikroskopu skaningowego. W podsumowaniu stwierdziła, że wszystkie badane warstwy charakteryzowały się nanokrystaliczną strukturą i były zbudowane w większości z kryształitów o wielkości wynoszącej od 10 do 20 nm. Struktura ta daje możliwość uzyskania innowacyjnych nanomateriałów cienkowarstwowych o nowych i odmiennych właściwościach w porównaniu do materiałów w formie litej.

Wydaje mi się, że analiza statystyczna uzyskanych wyników przedstawiona przez doktorantkę jest ukazana w pracy zbyt słabo. Brak zaznaczenia istotności w opisie wyników i pod rysunkami przedstawiającymi wyniki, jak w podrozdziale 4.3.3. Z opisu można wnioskować, że statystyka została wykonana, ale nie jest to wystarczająco pokazane w pracy. W rozdziale „Materiał i metody” warto również wyodrębnić w osobnym podrozdziale opis zastosowanych metod statystycznych. W przyszłych publikacjach warto jest to uwzględnić.

Pani magister Małgorzata Osękowska przeprowadziła dyskusję z dużym znawstwem podobnych prac w piśmiennictwie światowym. Trzeba przyznać, że wyniki przedstawione w recenzowanej pracy zachęcają do dalszych badań i stanowią podstawę do opracowania nowych biomateriałów cienkowarstwowych o kontrolowanym poziomie oddziaływania zarówno na komórki eukariotyczne, jak i drobnoustroje. W dyskusji doktorantka stwierdza, że wraz ze wzrostem ilości tytanu w cienkich warstwach Cu-Ti zmienia się ich struktura aż do uzyskania ziarnistej struktury. Warstwy zawierające więcej niż 83% at. miedzi wywierają negatywny wpływ na mysie fibroblasty aż do ich śmierci przy powłokach zawierających tylko miedź. Natomiast warstwy zawierające więcej niż 25% at. miedzi w swoim składzie wykazują silne działanie przeciwbakteryjne. Ważny jest również stopień utlenienia jonów miedzi.

Pracę kończą wnioski, które są odpowiedzią na postawione wcześniej cele pracy.

1. Opracowano metodykę badania nanomateriałów cienkowarstwowych o zróżnicowanym poziomie aktywności biologicznej. Innowacyjność metody polega na bezpośredniej ekspozycji zawiesiny bakterii o znanym mianie na cienkie warstwy w przedziałach czasowych 0, 3, 6, 24 godz. Wprowadzone zmiany w badaniu oceny zdolności komórek do proliferacji dotyczyły optymalnej długości ekspozycji (8 dni) na cienkie warstwy Cu-Ti. Natomiast w badaniu bezpośrednim kontaktu materiału z komórkami fibroblastów wybrano ekspozycję komórek bezpośrednio wysiewanych na cienką warstwę.
2. Stwierdzono, że skład materiałowy cienkich warstw Cu-Ti determinuje ich właściwości strukturalne. Cienkie warstwy o zawartości miedzi większej niż 53% at. wywołują efekt cytotoksyczny, ograniczając zdolność komórek do proliferacji oraz negatywnie wpływają na ich morfologię. O stopniu aktywności warstwy decyduje ilość uwolnionych jonów do środowiska oraz proporcja jonów na pierwszym oraz drugim stopniu utlenienia znajdujących się powierzchni. Wszystkie warstwy na bazie Cu-Ti wykazywały właściwości antydrobnoustrojowe.
3. Wybrano optymalny skład materiałowy nanokrystalicznej cienkiej warstwy na bazie Cu-Ti, który wykazuje właściwości niecytotoksyczne dla mysich fibroblastów i zarazem bakteriobójcze dla *S.aureus* oraz *E.coli*. Jest to 25% at. Cu i 75% at. Ti. Należy podkreślić, że kontakt pośredni ze 100% wyciągiem z tego materiału nie wpływał na fazy cyklu komórkowego, indukcję apoptozy czy zmiany morfologiczne.

We wnioskach zdanie "O stopniu aktywności warstwy decyduje ilość uwolnionych jonów do środowiska oraz proporcja jonów na pierwszym oraz drugim stopniu utlenienia znajdujących się powierzchni" warto jest poprawić, ponieważ nie brzmi dobrze stylistycznie.

Piśmiennictwo liczy aż 228 pozycji literaturowych w języku polskim i angielskim. W skład niego wchodzi oryginalne prace naukowe, doniesienia konferencyjne, odnośniki do stron internetowych oraz książki. Piśmiennictwo ułożono alfabetycznie i cytowano w sposób jasny i prawidłowy w tekście rozprawy doktorskiej. Duża ilość cytowań i pozycji piśmiennictwa świadczy o dobrym skonfrontowaniu opisywanego zagadnienia z osiągnięciami innych badaczy.

Podsumowując, doktorantka w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej wykazała, że potrafi samodzielnie zaplanować cel badawczy i skutecznie przeprowadzić badania. Przeprowadzone badania wykonane były skrupulatnie i zgodnie z obowiązującymi normami dla tego typu badań. Należy również podkreślić, że były bardzo pracochłonne. Duży dorobek naukowy Pani magister Małgorzaty Osękowskiej uzyskany przed doktoratem oraz przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, którą oceniam bardzo wysoko, skłaniają mnie do wnioskowania o wyróżnienie dysertacji stosowną nagrodą.

Rozprawa doktorska Pani magister 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 w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz 595, z późn. Zm.) i § 6.3 Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Stawiam zatem wniosek o dopuszczenie Pani magister Małgorzaty Osękowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Albert Czerski

