

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN, prof. UWr
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@uwr.edu.pl

Wrocław, 16.05.2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Michaliny Ehlert

**pt. „Wytwarzanie i charakterystyka układu: implant metaliczny/tlenkowa warstwa
pośrednia/hydroksyapatyt oraz badanie jego interakcji z ludzkimi, mezenchymalnymi
komórkami macierzystymi”**

Powierzona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Michaliny Ehlert została wykonana pod kierunkiem Pana prof. UMK dr. hab. Piotra Piszczka z Katedry Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz promotorki pomocniczej dr hab. Aleksandry Radtke. Rozprawa doktorska jest dziełem zrealizowanym w ramach doktoratu wdrożeniowego w oparciu o umowę trójstronną pomiędzy Doktorantką, firmą Nano-implant Sp. z o.o., a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu i była współfinansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (obecnie Ministerstwo Edukacji i Nauki). Temat dysertacji jest interdyscyplinarny i dotyczy tematyki biomateriałów bazujących na stopie Ti6Al4V. Podjęcie tematyki badań związanej z wytwarzaniem i analizą potencjalnych implantów kostnych najnowszych generacji jest istotne z kilku powodów. Po pierwsze, implanty kostne stanowią ważny element terapii i leczenia urazów, chorób oraz zaburzeń kostno-stawowych. Ich stosowanie pozwala na przywrócenie funkcji i ruchomości kończyn, zmniejszenie bólu oraz poprawę jakości życia pacjentów. Po drugie, rozwój technologii i nauki umożliwia tworzenie implantów o coraz lepszych właściwościach mechanicznych oraz biologicznych, co przekłada się na zwiększenie ich skuteczności i trwałości oraz zmniejszenie ryzyka odrzucenia przez organizm. Po trzecie, badania nad implantami kostnymi i ich wytwarzaniem pozwalają na lepsze zrozumienie oddziaływania pomiędzy implantem a tkankami organizmu oraz identyfikację najlepszych strategii projektowania, produkcji i implantacji. Wreszcie, stop Ti6Al4V jest jednym z najczęściej stosowanych materiałów do produkcji implantów kostnych ze względu na swoje odpowiednie właściwości mechaniczne, biokompatybilność z organizmem człowieka i łatwość obróbki.

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN, prof. UWr
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@uwr.edu.pl

Z tego punktu widzenia, dalsze modyfikacje implantów metalicznych bez żadnych wątpliwości można uznać za działania pożądane, ważne, aktualne i w pełni uzasadnione.

Rozprawa doktorska Pani mgr Michaliny Ehlert została przygotowana w języku polskim i składa się na nią pięć związanych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w czasopiśmie o międzynarodowej cyrkulacji, tj. *International Journal of Molecular Sciences* (wydawnictwo MDPI; IF₂₀₂₁ = 6,208), *Materials* (MDPI; IF₂₀₂₁ = 3,748; 3 prace) oraz *Journal of Functional Biomaterials* (MDPI; IF₂₀₂₁ = 4,901). W moim subiektywnym odczuciu, publikowanie prac w jednym wydawnictwie, w tym przypadku jest to MDPI, może wiązać się z pewnymi ryzykami. Jednak moim zadaniem, jako recenzenta rozprawy doktorskiej, nie jest ocena motywacji, które doprowadziły do wyboru wydawnictwa, na który zapewne mały wpływ miała Kandydatka do stopnia, ale udokumentowanych osiągnięć Doktorantki w ramach realizacji zadań przewidzianych w projekcie naukowym, który jest niezaprzeczalnie ciekawy, interdyscyplinarny i zawiera elementy nowości naukowej.

Kompilację prac poprzedza streszczenie w języku polskim oraz angielskim, autoreferat, który zawiera wstęp do tematyki, oraz omówienie wyników badań własnych wraz z podsumowaniem. W przeglądzie aktualnego stanu wiedzy, Doktorantka definiuje pojęcie biomateriału oraz omawia generacje biomateriałów, podając szereg starannie dobranych przykładów. Następnie omawia możliwe oddziaływania na pograniczu biomateriału i tkanki kostnej. W tej części Doktorantka szczegółowo omówiła budowę i skład chemiczny tkanki kostnej, proces osteointegracji oraz rolę mezenchymalnych komórek macierzystych w osteogenezie. Następnie, kandydatka dokonała charakterystyki biomateriałów metalicznych, słusznie ograniczając swoje rozważania do materiałów bazujących na tytanie i jego stopach, w tym na stopie Ti6Al4V. W kolejnym rozdziale czytelnik zapoznaje się z metodami modyfikacji powierzchni implantów tytanowych, mianowicie: utlenianiem elektrochemicznym, za pomocą nadtlenu wodoru i w środowisku alkalicznym. Wstęp literaturowy kończy się omówieniem metod wytwarzania powłok hydroksyapatytowych na implantach metalicznych. Ten 25-stronicowy wstęp jest bardzo dobrym wprowadzeniem do analizy wyników badań własnych Autorki dysertacji, pozostawiając recenzenta w przekonaniu, że sprawnie analizuje i interpretuje dane literaturowe. We wstępie literaturowym, Doktorantka odwołuje się do 186 aktualnych odnośników literaturowych, z których niemal wszystkie są anglojęzyczne. Ta część doktoratu została przygotowana rzetelnie i nie wzbudza moich

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN, prof. UWr
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@uwr.edu.pl

zastrzeżeń. Poniżej zamieszczam kilka uwag, które wymieniam z racji obowiązku wynikającego z roli recenzenta pracy, a nie wpływają na pozytywny odbiór tej części opracowania:

1. Na rysunku 1, wśród przykładów biomateriałów II generacji Doktorantka podaje, m.in. bioszkło i dalej stosuje skrót BG, którego nie znalazłem w wykazie skrótów. Czy czasami skrót ten nie odnosi się właśnie do bioszkieł? Zazwyczaj w literaturze anglojęzycznej skrót BG jest akronimem słowa „bioglass”.
2. Na rysunku 2, Autorka zalicza do materiałów ceramicznych bioszkła. Stąd moje pytanie, jak Doktorantka rozumie pojęcie bioszkieł i co ją skłoniło do zestawienia tej grupy biomateriałów z materiałami ceramicznymi? Czy pod względem strukturalnym takie przyporządkowanie jest właściwe?
3. Uwaga do całej pracy: zgodnie z polskimi zwyczajami typograficznymi część dziesiętną oddziela się przecinkiem, a kropka służy do innych celów, takich jak na przykład oddzielanie tysięcy.

W zasadniczej i najciekawszej części pracy (rozdział 4. „Streszczenie zbioru artykułów wchodzących w skład rozprawy”) Doktorantka opisała wyniki badań własnych opublikowanych w serii pięciu artykułów (P1-P5). W niniejszych pracach Autorka skupiła się głównie na projektowaniu i wytwarzaniu bezpiecznych dla zdrowia pacjenta implantów, które składają się ze stopu Ti6Al4V. Stop ten wykazuje wysoką biogodność z organizmem człowieka, co stanowi przewagę przy projektowaniu współczesnych implantów. W pierwszym artykule, P1 (*Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5642), przedstawiono proces modyfikacji powierzchni podłoża ze stopu Ti6Al4V poprzez aktywację w różnych roztworach kwasów, a następnie utlenianie 30% roztworem nadtlenu wodoru. Kolejne artykuły, P2 (*Materials* **2020**, *13*, E1574) i P3 (*Materials* **2021**, *4*, 806), opisują modyfikacje powierzchni uzyskiwane odpowiednio poprzez utlenianie elektrochemiczne i w środowisku alkalicznym. Z kolei, wyniki badań nad komórkami macierzystymi pochodzącymi z tkanki tłuszczowej i ich oddziaływaniem z otrzymanymi warstwami przedstawiono w artykułach P1-P3. Następnie, w artykułach P4 (*Materials* **2022**, *15*, 6925) i P5 (*J. Funct. Biomater.* **2022**, *13*, 271) opisano najbardziej obiecujące warstwy, które wybrano na podstawie ich właściwości fizykochemicznych, mechanicznych i biointegracyjnych, a następnie wykorzystano jako powierzchnie spajające stop Ti6Al4V z powłoką hydroksyapatytową (HA), wytworzoną metodą katodowego osadzania elektrolitycznego. Przy czym, w artykule P4 wyjaśniono właściwości fizykochemiczne i mechaniczne układów Ti6Al4V/warstwa pośrednia/HA, natomiast w artykule P5 opisano szczegółowo ich właściwości biologiczne. Każdy artykuł w kolejnym rozdziale jest uzupełniony



dr hab. Łukasz JOHN, prof. UWrocław
 Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
 Zakład Technologii Chemicznej
 ul. F. Joliot-Curie 14
 50-383 Wrocław
 e-mail: lukasz.john@uwr.edu.pl

krótkim wstępem, podsumowaniem najważniejszych wniosków wynikających z analizy badań własnych. Ta część referatu jest napisana starannie, logicznie, choć Autorka nie ustrzegła się od niezręcznych sformułowań, np. „*Włóknista morfologia podłoży utlenionych pod chłodnicą zwrotną jest nieco bardziej wyraźna aniżeli podłoży ogrzewanych w inkubatorze.*” (str. 39), „*ADSCs wykazały zdolność do funkcjonalizowania początkowo „nieprzyjaznej” powierzchni, co czyni ją odpowiednią dla wzrostu komórek i przygotowuje ją na bardziej wyspecjalizowane i wymagające komórki.*” (str. 43), czy „*...Komórki [...] wykazywały silną adhezję na powierzchniach powierzchni próbek...*” (str. 51). Poza tymi nielicznymi „wpadkami”, praca jest napisana prawidłowym językiem specjalistycznym. Po starannej analizie tej części autoreferatu oraz prac oryginalnych nasuwają się pytania/uwagi, do których proszę, aby Doktorantka odniosła się podczas publicznej obrony:

1. Na str. 40, Autorka opisuje średni rozmiar domen krystalicznych faz anatazu i rutylu ditlenku tytanu. Część z nich została uwzględniona w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Materials* **2020**, 13, 2649 (odnośnik 187), której Doktorantka jest współautorką. Podobną uwagę mam również do artykułu opublikowanego w *Journal of Clinical Medicine* **2019**, 8, 272 (odnośnik 124, str. 45). Dlaczego zatem prace te, mimo uwzględnienia ich w dyskusji nad wynikami badań własnych, nie zostały włączone do cyklu artykułów?
2. Doktorantka niefortunnie stosuje określenie „próba” w odniesieniu m.in. do utlenionych stopów Ti6Al4V opisanych w rozprawie. Uważam, że zrzętniej byłoby postąpić się określeniem „materiał/biomateriał na bazie...”, itp.
3. Autorka pracy używa określenia „kąt zwilżania dla wody” (np. na str. 41), a powinna „kąt zwilżania wody”.
4. W opisie wyników składających się na artykuł P1, brak wniosku dotyczącego zwiększonej hydrofobowości badanych stopów po procesie utleniania chemicznego powierzchni. Podobnie w przypadku zmniejszenia paramateru chropowatości w funkcji czasu powierzchni stopu modyfikowanego „pod chłodnicą zwrotną”. Autorka odwołuje się do zmierzonej wartości $S_a = 0,10 \mu\text{m}$, ale nie podaje referencyjnych wartości literaturowych. Zatem nasuwa się pytanie, czy wyznaczona wartość jest tą oczekiwaną?



dr hab. Łukasz JOHN, prof. UWr
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@uwr.edu.pl

5. Na str. 41, Autorka napisała, że „...w przypadku implantów o długim czasie działania powinny charakteryzować się odpowiednią przyczepnością do podłoża metalicznego.” Odpowiednią, czyli jaką?
6. W ocenie adhezji i proliferacji wybranych linii komórkowych Doktorantka stosuje dwa punkty czasowe, tj. 24 i 72 godziny. Zazwyczaj parametry te ocenia się również po dwóch dobach. Skąd zatem taki wybór? Z kolei, na str. 51, przy opisie testów biologicznych opublikowanych w pracy P3, pojawiają się czasy 24, 72 i 120 godzin. Proszę o komentarz.
7. Na str. 42 jest napisane: „Eksperymenty kokulturowe wykazały nieco inne wyniki niż te opisane dla pojedynczych linii komórkowej.” Jak czytelnik ma to rozumieć?
8. W podpisie do rysunku 9 (str. 47) nie podano informacji co oznaczają białe strzałki na obrazie mikroskopowym A.
9. W pracy P3 w celu wytworzenia na styku faz hydroksyapatytu Doktorantka zastosowała roztwór symulowanego płynu ustrojowego (SBF), prowadząc inkubację metodą statyczną. Jakie Autorka widzi zalety i wady tej metody w porównaniu z metodą dynamiczną? Czy obserwowano również krystalizację na powierzchni implantu innych soli, np. chlorków, węglanów, siarczanów(VI), węglanofosforanów(V), itp.? Co Doktorantka rozumie pod pojęciem apatyty, który stosuje przy opisie soli nieorganicznych, które wytrąciły się na powierzchni zmodyfikowanego stopu?
10. Czy zdanie pojawiające się na str. 51: „Komórki ADSCs wykazywały silną adhezję na powierzchniach powierzchni próbek T-S i T5-S z powłoka hydroksyapatytu powstałą po 28 dniach inkubacji w roztworze SBF.” jest prawdziwe? Czy po 28 dniach jedyną obserwowaną fazą był hydroksyapatyt?
11. Komentarz do pracy P3: Czy nie rozważano inkubacji zmodyfikowanych stopów Ti6Al4V w płynach dedykowanych do krystalizacji hydroksyapatytu, np. tą zastosowaną w pracy P4?
12. Na str. 54 jest napisane: „...wraz ze wzrastającą gęstością prądu obserwowano zmianę struktury HA z rozproszonej na gęsto upakowaną (Rysunek 12 a-h), oraz wzrost grubości powłok.” Ja rozumieć to zdanie? Czy chodzi o wzrost agregacji hydroksyapatytu? Czy do tego odnosi się pojęcie „gęstego upakowania”?



WYDZIAŁ CHEMII

dr hab. Łukasz JOHN, prof. UWr
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@uwr.edu.pl

13. Temat rozprawy doktorskiej, biorąc pod uwagę jej treść, mógłby zostać bardziej uściślony, precyzując na jakiej bazie jest podłoże metaliczne i jaki ma skład tlenkowa warstwa pośrednia.

Powyższe uwagi i pytania wynikają z ciekawości recenzenta i pewnych wątpliwości jakie pojawiają się po uważnej analizie całego opracowania. Natomiast nie wpływają one na ogólny pozytywny odbiór rozprawy doktorskiej.

Ostatnim rozdziałem autoreferatu jest opis wdrożenia, w którym zwięźle określony zostaje element nowości opracowania Doktorantki, w którym czytamy: „Wynikiem przeprowadzonych badań jest opracowanie technologii dwustopniowej modyfikacji powierzchni implantu ze stopu Ti6Al4V, co stanowi innowacyjne rozwiązanie gotowe do zastosowania w produkcji nowej generacji implantów.” Oczywiście wymaga to jeszcze pogłębionej weryfikacji obejmującej m.in. badania *in vivo*, do czego Autorka pracy nawiązuje w dalszej części opisu. Warto w tym miejscu dodać, że modyfikacja powierzchni stopu Ti6Al4V pokrytej warstwą TiO₂ o morfologii nanoporowatej stanowi przedmiot polskiego zgłoszenia patentowego P.435368 (WIPO ST 10/C PL435368).

Analiza oświadczeń nie wzbudza zastrzeżeń recenzenta. Po ich analizie można stwierdzić, że większość prac związanych z syntezą i chemiczną modyfikacją powierzchni wykonała Doktorantka. Jej udział w testach biologicznych jest również dominujący choć z pomocą doświadczonych współpracowników. Podobnie analiza właściwości mechanicznych została wykonana przez innego specjalistę z dziedziny inżynierii materiałowej. Powyższa współpraca jest nieodzowna i pożądana w projektach interdyscyplinarnych.

Pani mgr Michalina Ehlert jest bardzo dobrze przygotowaną Naukownicą do prowadzenia badań interdyscyplinarnych. Ukończyła magisterium nie tylko z chemii, ale również z biologii i dodatkowo posiada licencjat z biologii z geografiją. Na pozostały dorobek Doktorantki składa się 6 publikacji z listy *Journal Citation Reports*, wydanych głównie przez wydawnictwo MDPI. Ponadto jest współautorką dwóch publikacji w polskim czasopiśmie *Engineering of Biomaterials/Inżynieria Biomateriałów*, które jest wydawane przez Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów i Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH w Krakowie. Była również niezwykle aktywna na konferencjach naukowych prezentując, m.in. 13 komunikatów ustnych i 8 plakatów. Brała również udział w 5 projektach badawczych, głównie

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN, prof. UWr
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@uwr.edu.pl

dedykowanych dla młodych naukowców. Za swoją pracę naukową zdobyła liczne nagrody i wyróżnienia.

Reasumując, po uważnej analizie przesłanej dokumentacji jestem przekonany, że Pani mgr Michalina Ehlert jest już ukształtowaną młodą Naukowniczą, podejmującą ciekawe kierunki badań i posiadającą wszelkie predyspozycje pozwalające na analizę wyników i wyciąganie trafnych wniosków naukowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Michaliny Ehlert spełnia wymogi i warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. "Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (Dz.U. z 2021 r. poz.478 z późn. zm.) stawiane pracom składanym przez osoby ubiegające się o stopień naukowy doktora i **z przekonaniem wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania.**