

Zabrze, 08.11.2022 r.

dr hab. inż. Janusz Szewczenko, prof. PŚ
Katedra Biomateriałów i Inżynierii Wyrobów Medycznych
Wydział Inżynierii Biomedycznej
Politechnika Śląska
ul. Roosevelta 40
41-800 Zabrze

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. dent. Izabeli ZIENIEWSKIEJ-SIEMIĘCZUK
pt.: „Ocena wpływu zespoleń tytanowych poddanych anodowaniu twardemu na
cytotoksyczność, stres oksydacyjny oraz zjawiska korozji w hodowlach komórkowych
fibroblastów ludzkich”
zrealizowanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Anna Zalewskiej
i mentora mgr Jacka Kropiwnickiego

Recenzja rozprawy doktorskiej została opracowana na podstawie uchwały Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 27.10.2022 roku oraz zlecenia Dziekana Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim.

1. Charakterystyka ogólna pracy

Obecnie coraz powszechniejsze staje się wykorzystanie do zabiegów osteosyntezy, w tym zuchwy, stabilizatorów wykonanych z tytanu i jego stopów. Do niedawna tytan i jego stopy uważane były za biozgodne. Wraz z rosnącą popularnością i czasem stosowania implantów metalowych wzrasta liczba doniesień o reakcjach okołowszczepowych oraz ogólnych w organizmie wynikających z ich implantowania. Wynika to nie tylko z oddziaływania toksycznych pierwiastków stopowych, takich jak wanad lub obojętny po spasywowaniu glin, lecz również tytanu. Spowodowało to potrzebę modyfikowania warstwy wierzchniej implantów ze stopów tytanu dla zwiększenia odporności korozyjnej oraz ograniczenia ilości jonów metali, przenikających do tkanek otaczających implant.

Poprawę biokompatybilności implantów tytanowych uzyskuje się wieloma metodami modyfikowania ich warstwy wierzchniej. Wiele z nich nie zapewnia jednak uzyskania jednorodnych warstw na implantach, zwłaszcza o złożonych kształtach. Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie utleniania anodowego, w wyniku którego wytwarzana jest na implantach, z tytanu i jego stopach, jednorodna warstwa pasywna. Skład chemiczny, struktura, grubość i topografia warstwy pasywnej zależą od wielu czynników, z których głównymi są warunki

prądowe, skład chemiczny, pH i temperatura kąpieli oraz warunki hydrodynamiczne procesu utleniania anodowego. Najczęściej na powierzchni implantów krótkotrwałych wytwarza się ciągle, jednorodne i składające się głównie z rutylu warstwy pasywne, rzadziej porowate mające zapewnić osteointegrację pomiędzy implantem a tkanką kostną. Wpływ parametrów utleniania na właściwości fizykochemiczne warstw pasywnych najczęściej określa się na podstawie badań korozyjnych oraz stężenia produktów degradacji przenikających do sztucznych roztworów symulujących płyny ustrojowe. Badania te uzupełnia się testami cytotoksyczności.

Doktorantka w rozprawie znacznie wykracza poza standardowe podejście do badań utlenianych anodowo stopów tytanu, analizując wpływ produktów degradacji stopu tytanu na stan równowagi redoks w hodowlach komórkowych fibroblastów. Ponadto badania przeprowadza, wykorzystując nie tylko standardowo utleniany stop Ti6Al4V, lecz również stop poddany procesowi utleniania anodowego „na twardo” w zasadowej kąpieli, czego efektem było wytworzenie pasywnej porowatej warstwy wierzchniej.

Problematykę recenzowanej pracy uważam za aktualną, uzasadnioną oraz dobrze ukierunkowaną, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i utylitarnym. Wpisuje się ona w główny nurt badań z zakresu inżynierii wyrobów medycznych, realizowanych zarówno w ośrodkach medycznych, jak i technicznych.

Rozprawa doktorska ma tradycyjny układ i składa się części literaturowej (str. 10-64) oraz części doświadczalnej (str. 65-198). Spis literatury obejmuje 226 pozycji. Zaprezentowany przegląd piśmiennictwa jest bardzo obszerny i został opracowany na podstawie pozycji literaturowych, w większości obejmujących ostatnie dziesięciolecie. Świadczy to o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do podjęcia problematyki badawczej. Pracę uzupełniają wykaz skrótów, spis rycin (16 pozycji) i tabel (42 pozycje), streszczenie w języku polskim i angielskim oraz podziękowania.

Praca powstała w ramach projektu pt. „Krajowe Międzysektorowe Studia Doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, nr POWR.03.02.00-00-I050/16.

2. Ocena części literaturowej rozprawy

Część literaturowa podzielona jest na siedem podrozdziałów. W pierwszym rozdziale, poświęconym tytanowi i jego stopom, opisano proces otrzymywania tytanu, scharakteryzowano odmiany alotropowe tytanu, a także wpływ pierwiastków stopowych na ich strukturę oraz właściwości fizyczne. Ponadto przedstawiono problematykę zastosowania tytanu i jego stopów na implanty, w szczególności wykorzystywane w chirurgii twarzowo-szczękowej. Drugi podrozdział Doktorantka poświęciła ogólnemu opisowi procesów korozyjnych metali, z uwzględnieniem tytanu i jego stopów. Opisała również wpływ środowiska korozyjnego oraz warstwy pasywnej na odporność korozyjną tytanu i jego stopów. Rozdział trzeci stanowi

charakterystyka procesu utleniania anodowego jako metody modyfikacji powierzchni implantów z tytanu i jego stopów. Doktorantka opisała różne metody utleniania anodowego oraz wpływ składu chemicznego kąpieli i parametrów procesu na właściwości wytworzonych warstw pasywnych, w szczególności na topografię, skład chemiczny i grubość. W kolejnym podrozdziale przedstawiono podstawowe informacje na temat składników tkanki kostnej, scharakteryzowano komórki kostne oraz ich udział w procesie przebudowy tkanki kostnej. Podrozdział 5. zawiera opis fibroblastów i ich roli w procesach regeneracyjnych organizmu, w tym wpływu czynników wzrostu fibroblastów na proces przebudowy tkanki kostnej. Reaktywne formy tlenu, ich podział, znaczenie dla funkcjonowania organizmu, mechanizmy powstawania oraz reaktywność omówiono w podrozdziale 6. W szczególności opisano powstawanie reaktywnych form tlenu: w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, fagocytozie oraz procesie korozji tytanowych implantów. Ponadto opisano mechanizmy oraz znaczenie oksydacyjnych modyfikacji lipidów, białek oraz materiału genetycznego. W ostatnim, 7. podrozdziale, Doktorantka charakteryzowała wybrane naturalne antyoksydanty opisując ich występowanie, właściwości oraz mechanizmy reakcji antyoksydacyjnych z ich udziałem.

Część literaturową rozprawy oceniam pozytywnie. Dokonana przez Doktorantkę analiza i synteza literatury świadczą o dobrej znajomości problematyki badawczej i stanowi dobrą teoretyczną podstawę podjętego tematu rozprawy. Jednakże uważam, że podrozdział 3. rozprawy jest z jednej strony zbyt rozbudowany i ogólny (opis rodzajów korozji niewystępujących w organizmie), a z drugiej nie uwzględnia wpływu czynników mechanicznych na rozwój korozji implantów. Sądzę, że cenne uzupełnienie podrozdziału 4. stanowiłby opis przebiegu procesów naprawczych, zachodzących w tkance kostnej, szczególnie żuchwy zespolonej implantami płytkowymi.

3. Ocena części merytorycznej rozprawy

W rozdziale drugim Doktorantka, po opisie problematyki stosowania implantów płytkowych do osteosyntezy żuchwy w aspekcie biokompatybilności stosowanych do ich wykonania stopów tytanu po różnych zabiegach modyfikacji warstwy wierzchniej, określa 7 bardzo szczegółowych celów pracy. Tak szczegółowo sformułowane cele rozprawy, stanowiąc mogą jednocześnie jej program badawczy.

Rozdział 3. zawiera informacje o materiałach i metodach badawczych wykorzystanych w pracy. Badania w pracy przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (uchwała nr APK.002.280.2021).

Materiał do badań stanowiły próbki w formie krążków, wykonane ze stopu Ti6Al4V po różnych zabiegach modyfikacji powierzchni: polerowane mechanicznie (krążki surowe), utleniane anodowo w roztworze NaOH zgodnie z zaleceniami normy AMS2488D Anodic Treatment - Titanium and Titanium Alloys Solution pH 13 or Higher (anodowanie typu II – „na twardo”), utleniane anodowo w 0,5 M H₂SO₄ (anodowanie typu III). Jako grupę kontrolną wykorzystano

krążki z polistyrenu. Wszystkie próbki poddano zabiegowi sterylizacji parowej. Materiał do badań przygotowany został przez firmę ChM sp z o.o. (Lewickie, Polska), zgodnie z obowiązującymi zaleceniami norm ISO. Do badań biologicznych wykorzystano fibroblasty pozyskane z tkanki dziąsła ludzkiego (ludzkie niemodyfikowane genetycznie pierwotne fibroblasty dziąsła ludzkiego; Human Primary Gingival Fibroblasts, ATCC-PCS-201-018), (American Type Culture Collection, USA). W metodyce opisano sposób hodowli komórek oraz izolacji mitochondriów, które stanowiły obiekt badań.

Ponadto opisano metodykę badań, mających na celu określenie wpływu różnych zabiegów modyfikacji warstwy wierzchniej próbek ze stopu Ti6Al4V na fibroblasty. W pracy przeprowadzono badania cytotoxyczności oraz badania biochemiczne:

- w lizacie komórkowym oceniano: stężenie białka całkowitego oraz aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy glutationowej (GR), stężenie zredukowanego glutationu (GSH), całkowity status utleniający (TOS), całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAC), aktywność oksydazy NADPH (NOX) oraz stężenie oksydacyjnych uszkodzeń lipidów (malonylodialdehydu (MDA), adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami (4-HNE)) i białek (końcowych produktów utleniania białek (AOPP), zawartość grup disiarczkowych (SS), końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE)) oraz parametrów stresu nitrozacyjnego: nadtlenoazotynu (ONOO-) oraz 3-nitrotyrozyny (3-NT),
- w zawiesinie mitochondrialnej oceniono: funkcjonowanie łańcucha oddechowego poprzez pomiar aktywności kompleksu I i II, oksydazy cytochromu c (COX) i syntazy cytrynianowej (CS) oraz aktywność kaspazy-3 (CAS-3),
- w medium pobranym z komórek oznaczono: stężenie czynnika wzrostu fibroblastów FGF-2, stężenie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF-A), zawartość metali: tytanu, glinu, wanadu, stężenie białka całkowitego, całkowity status utleniający (TOS) i całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAC), stężenie oksydacyjnych uszkodzeń lipidów (malonylodialdehydu (MDA), adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami (4-HNE)) i białek (końcowych produktów utleniania białek (AOPP), zawartość grup disiarczkowych (SS), końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE)), oraz parametry stresu nitrozacyjnego: nadtlenoazotynu (ONOO-) oraz 3-nitrotyrozyny (3-NT).

Wszystkie badania przeprowadzono po czterech okresach ekspozycji fibroblastów na stop Ti6Al4V - po 1 dobie, 7, 14 i 21 dniach lub po 3, 6, 15 i 21 dniach. Rozdział ten zawiera wykazy zastosowanego sprzętu i odczynników chemicznych oraz informacje o zastosowanych do opracowania i oceny wyników badań metodach statystycznych.

Uważam, że rozdział ten został bardzo dobrze opracowany. Opis metodyki przeprowadzonych badań jest dokładny i umożliwia ich odtworzenie. Brak wszystkich parametrów procesu utleniania anodowego próbek wynika zapewne z faktu przygotowania ich przez komercyjną firmę, działającą na bardzo konkurencyjnym rynku implantów. Z drugiej strony przygotowanie ich w warunkach przemysłowych, zgodnie z obowiązującymi standardami, zapewnia ich

powtarzalność, co czasami jest trudne do uzyskania w warunkach laboratoryjnych. Moim zdaniem podnosi to wartość omawianej dysertacji. Program badań znacząco wykracza poza standardowy zakres, jednakże sądzę, że uzupełnienie go o badania topografii powierzchni i zwilżalności badanych próbek w kontekście badań komórkowych, znacznie podniosłoby wartości poznawcze i utylitarne rozprawy.

Wyniki badań przedstawiono w rozdziale 4. Rozdział ten zawiera 35 tabel. Wyniki badań poddane były analizom statystycznym, mającym na celu wskazanie istotnych statystycznie różnic. Wyniki tych analiz przedstawiono bezpośrednio po każdej tabeli, co bardzo ułatwia ich interpretację.

Niezmiernie obszerna dyskusja wyników badań (rozdział 7.) obejmuje wielowymiarową i interdyscyplinarną interpretację uzyskanych wyników, porównania do badań innych autorów oraz osobiste przemyślenia Doktorantki. Wskazuje to jednoznacznie na jej dobre przygotowanie do prowadzenia badań naukowych. Utwierdza mnie w tym również, krytyczne podejście do przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników. Czytelność dyskusji utrudnia brak konsekwencji w odwoływaniu się do wyników badań (brak odniesienia do numeru tabeli).

W rozdziale 6. przedstawiono wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Przedstawionych siedem wniosków, stanowi odpowiedź na sformułowanych w pracy siedem celów. Potwierdza to jednoznacznie, iż postawione przez Doktorantkę cele zostały osiągnięte.

Na podstawie lektury pracy, nasuwają mi się następujące uwagi krytyczne:

- na stronie 15. napisano: „Należy podkreślić, że obecnie wiele ze stosowanych implantów wykonywanych jest z kilku różnych stopów. Wynika to z faktu, iż implanty składają się często z wielu elementów, a każdy element wszczepu powinien charakteryzować się innymi cechami.” Uważam to stwierdzenie za bardzo niefortunne, ponieważ łączenie w ramach jednego systemu stabilizacji różnych materiałów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych w organizmie stanowić może ogniwo galwaniczne i prowadzić do rozwoju korozji elektrochemicznej. Odmienne właściwości mechaniczne elementów systemów wykorzystywanych do stabilizacji odłamów (najczęściej płytek) uzyskuje się poprzez zróżnicowaną konstrukcję oraz wymiary;
- str. 68, tabela 6. nie przedstawia składu chemicznego badanego stopu Ti6Al4V, a raczej poziomy graniczne pierwiastków stopowych tego stopu wg normy ISO 58-32-3;
- w pracy krążki ze stopu Ti6Al4V poddane jedynie polerowaniu mechanicznemu określane są bardzo często jako „bez powłoki” (w domyśle pasywnej); jest to nieprawdą, ponieważ stopy te w kontakcie z tlenem ulegają samopasywacji, w wyniku której powstaje warstwa pasywna o grubości do kilkunastu nm, składająca z tlenków pierwiastków stopowych, natomiast warstwy powstałe w wyniku utleniania anodowego są znacznie grubsze i składają się głównie z tlenku tytanu;
- na stronach 69., 152., 154. i 156. nie podano jednostek odpowiednio chropowatości oraz stężenia tytanu, glinu i wanadu.

Szeroki program badań oraz uzyskane wyniki skłaniają mnie do pytań o charakterze dyskusyjnym:

- W pracy zamieszczono zdjęcia próbek polerowanych i standardowo utlenianych anodowo, nie ma natomiast próbki utlenianej anodowo na twardo. Czy jest to zabieg przypadkowy czy celowy?
- W pracy maksymalny czas ekspozycji fibroblastów na stop Ti6Al4V o zmodyfikowanych w różnych warunkach warstwach wierzchnich wynosił 21 dni. Czy biorąc pod uwagę przebieg procesów naprawczych w żuchwie nie jest on zbyt długi?
- Z pracy wynika, że największe stężenie jonów metali uwalnianych ze stopów tytanu obserwowano dla próbek utlenianych anodowo „na twardo”, natomiast te same próbki wykazują najmniejszy negatywny wpływ na równowagę reakcji redoks ludzkich fibroblastów. Z punktu widzenia biokompatybilności stopów tytanu przeznaczonych na implanty istotniejsza jest równowaga reakcji redoks czy stabilność powłoki?
- Które spośród tak wielu przeprowadzonych w pracy analiz biochemicznych są najistotniejsze z punktu widzenia oceny biokompatybilności warstw pasywnych na stopach tytanu, które natomiast z punktu widzenia oddziaływania implant-tkanka kostna (osteokondukcja, osteoindukcja)?

Wymienione wcześniej uwagi nie wpływają na wartość naukową rozprawy. Najistotniejsze osiągnięcia recenzowanej rozprawy z punktu widzenia poznawczego stanowią:

- opracowanie metodyki badawczej, umożliwiającej przeprowadzenie badań wpływu stopu Ti6Al4V o zróżnicowanych warstwach wierzchnich na ludzkie fibroblasty,
 - określenie wpływu stopu Ti6Al4V o zróżnicowanych warstwach wierzchnich, na równowagę reakcji redoks ludzkich fibroblastów,
- natomiast z punktu widzenia utylitarne:
- wykazanie, że spośród badanych warstw wierzchnich wytworzonych na stopach Ti6Al4V, najmniejszy negatywny wpływ na równowagę redoks ludzkich fibroblastów wywiera warstwa wytworzona w procesie utleniania anodowego w kąpeli 0,5 M H₂SO₄ („na twardo”).

4. Zagadnienia polemiczne i uwagi

Uwagi posiadające w większości charakter sugestii, dyskusji lub uporządkowania treści, przedstawione zostały w częściach poświęconych ocenie części literaturowej i merytorycznej rozprawy. Uwagi edycyjne, nieścisłości, sprzeczności oraz wyrażania żargonowe zostały Doktorantce przekazane podczas osobistej dyskusji.

Wniosek końcowy

Na podstawie analizy rozprawy doktorskiej Pani **lek. dent. Izabeli ZIENIEWSKIEJ-SIEMIĘCZUK** pod tytułem „**Ocena wpływu zespoleń tytanowych poddanych anodowaniu twardemu na cytotoksyczność, stres oksydacyjny oraz zjawiska korozji w hodowlach komórkowych fibroblastów ludzkich**” zrealizowanej pod kierunkiem promotora **prof. dr hab. Anny Zalewskiej** i mentora **mgr. Jacka Kropiwnickiego** stwierdzam, że pracę cechuje oryginalna i aktualna tematyka. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym rozeznaniem w analizowanej problematyce badawczej, umiejętnością planowania badań, doboru i stosowania nowoczesnych metod badawczych oraz analizy wyników badań.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2022 r. poz. 574) i wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie **lek. dent. Izabeli ZIENIEWSKIEJ-SIEMIĘCZUK** do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

