

Dr hab. Rafał Jurczakowski, prof. UW

Warszawa, dn. 31.10.2023 r.

Uniwersytet Warszawski

Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych

Pracownia Elektroanalizy i Elektrokatalizy Chemicznej

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Stróż**

**pt.: *Anodowe wytwarzanie i biofunkcjonalność warstw nanorurek tlenkowych na stopie Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr.***

Praca doktorska pt.: *Anodowe wytwarzanie i biofunkcjonalność warstw nanorurek tlenkowych na stopie Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr* autorstwa mgr inż. Agnieszki Stróż wykonana została na Wydziale Informatyki i Nauki o Materiałach Uniwersytetu Śląskiego w Instytucie Inżynierii Materiałowej pod kierunkiem dr hab. Bożeny Łosiewicz, prof. UŚ oraz dr hab. Grzegorza Dercza, prof. UŚ, który pełnił rolę promotora pomocniczego. Najważniejszą część pracy stanowi cykl dziesięciu oryginalnych jednotematycznych publikacji naukowych D1-D10, dotyczących zagadnień integralnie związanych z tematyką rozprawy. Prace te zostały opublikowane w języku angielskim w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. W przedstawionym do recenzji opracowaniu publikacje zostały poprzedzone 93 stronicowym przewodnikiem i streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Postęp w dziedzinie ortopedycznych metod rekonstrukcyjnych wykorzystywanych w leczeniu urazów, chorób nowotworowych, czy różnego rodzaju deformacji nie może istnieć bez równoległego rozwoju inżynierii materiałowej, celem wytwarzania nowych materiałów funkcjonalnych mających potencjalne zastosowanie w medycynie. Materiały wykorzystywane jako ortopedyczne implanty medyczne, są wykonane najczęściej ze stopów metali. Częstość wykorzystywane są one do ratowania ludzkiego życia. Nietypowe wykorzystanie tych materiałów oraz bardzo wysokie wymagania mechaniczne im stawiane, przy zachowaniu bioinertności, stanowi bardzo duże wyzwanie nie tylko dla składu stopu, ale również metod przygotowania jego powierzchni. W ostatnich latach, w związku z postępowaniem technologicznym wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem potencjału inżynierii nanostruktur w celu poprawy kontaktu pomiędzy biomateriałami i tkankami biologicznymi. Praca doktorska mgr inż. Agnieszki Stróż dotyczy wytwarzania nanostrukturalnych warstw tlenkowych na powierzchni stopu Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr, jest to praca interdyscyplinarna na pograniczu chemii, inżynierii materiałowej oraz nanotechnologii.

Na początku opracowania umieszczony został wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, w którym każda z prac opatrzona została syntetycznym komentarzem. Opisany przez doktorantkę udział własny w tych publikacjach pozwala stwierdzić jej znaczący udział zarówno na etapie przygotowania materiałów, jak również planowania i opracowania metodologii badań, interpretacji wyników oraz przygotowania manuskryptów. Zadeklarowany ponadprzeciętny udział Doktorantki świadczy o jej dużym zaangażowaniu i samodzielności.

W dalszej części pracy Doktorantka przedstawiła wstęp teoretyczny, w którym nakreśliła potrzeby współczesnej implantologii i medycyny regeneracyjnej. Doktorantka zwróciła uwagę na ogromny potencjał wynikający z rozwoju i wykorzystania nanotechnologii w syntezie innowacyjnych bionanomateriałów. Bardzo interesujący jest podany syntetyczny przegląd literatury, w którym Doktorantka opisała dotychczasowy stan wiedzy i skład stopów najczęściej wykorzystywanych jako biomateriały metaliczne. Doktorantka zwróciła również uwagę na kluczową rolę badań korozji tych materiałów oraz na toksyczność i kancerogenność niektórych powszechnie wykorzystywanych w tych celach metali, do których należą zwłaszcza wanad i glin. Doktorantka sprecyzowała, że badania tego typu mają szczególne znaczenie w przypadku implantów długoterminowych. Kandydatka zawarła w opracowaniu najistotniejsze problemy materiałowe implantów, i opisała biokompatybilność chemiczną i mechaniczną stopu Ti13Nb13Zr, na którym wytwarzała warstwy nanorurek tlenkowych. W stopie tym wyeliminowano toksyczny wanad i glin poprzez wprowadzenie niobu i cyrkonu. Stop charakteryzuje się niższym modułem Younga, co wpływa na jego większą biokompatybilność względem innych tego typu materiałów na bazie tytanu.

Dalsza część wstępu literaturowego poświęcona jest roli przygotowania powierzchni implantu i jego wpływie na procesy osteointegracji. Doktorantka omówiła mechanizm osteointegracji implantów tytanowych, słusznie zwracając szczególną uwagę na rolę powierzchniowych tlenków metali. Doktorantka opisała również wpływ właściwości fizykochemicznych powierzchni na wiązanie między metalem a tkanką miękką, co ma kluczowe znaczenie w prewencji okołointplantowych stanów zapalnych. Następnie Doktorantka przedstawiła zalety stosowania elektrochemicznych metod modyfikacji powierzchni biomateriałów i szczegółowo omówiła warunki oraz mechanizm tworzenia nanorurek tlenkowych na powierzchni tytanu. Zgodnie z podziałem zaproponowanym przez Grimesa i Mora, Dyplomantka wyróżniła cztery generacje nanorurek (1G – 4G) ze względu na rodzaj zastosowanego elektrolitu, w którym były one otrzymane. Następnie Doktorantka szczegółowo opisała wcześniejsze prace naukowe dotyczące wytwarzania nanorurek na stopie Ti13Nb13Zr. Autorka omawia ich morfologię oraz przemiany strukturalne zachodzące

po procesie wyżarzania. Doktorantka opisuje zalety i biofunkcjonalność powierzchni po procesie modyfikacji stopów warstwami nanorurek. Wskazała na znaczący wpływ morfologii nanostruktur na oddziaływanie powierzchni z tkankami, a także szczegółowo opisała możliwość wykorzystania materiałów nanostrukturalnych do transportu leków.

Na podstawie przeglądu literaturowego Doktorantka jasno sprecyzowała cel pracy, który dotyczył próby opracowania innowacyjnego biomateriału na bazie biomedycznego stopu Ti13Nb13Zr do zastosowań jako implanty osteointegracyjne o zwiększonej biofunkcjonalności. Doktorantka podała również bardzo ambitny, szczegółowy plan badań obejmujący sprawdzenie możliwości kontroli morfologii nanorurek wytwarzanych na powierzchni stopu Ti13Nb13Zr w zależności od warunków eksperymentalnych. Przeprowadzenie charakterystyki właściwości biotribologicznych, mikromechanicznych, bioelektrochemicznych i biologicznych oraz chropowatości powierzchni stopu przed i po procesie anodowania. Zaplanowano również kontrolę jakości stopu przed i po procesie anodowania w przyspieszonych badaniach korozyjnych w komorze solnej oraz zbadanie możliwości zastosowania wytworzonych warstw nanorurek tlenkowych na powierzchni stopu Ti13Nb13Zr jako potencjalnych nośnik leków.

W dalszej części pracy Doktorantka opisała wyniki prowadzonych badań, które były przedmiotem publikacji D1-D10. W publikacji D1 Doktorantka opisała warunki otrzymywania bardzo regularnych nanorurek pierwszej generacji, które charakteryzowały się znacznie większą długością niż analogiczne struktury opisane wówczas w literaturze. Doktorantka szczegółowo zbadała właściwości korozyjne stopu Ti13Nb13Zr oraz stopu modyfikowanego nanorurkami tlenkowymi, wyznaczyła moduł impedancji przy częstotliwości 0,5 Hz dla stopów pokrytych nanorurkami 1G w roztworze soli fizjologicznej metodą lokalnej spektroskopii impedancyjnej. Co ciekawe Doktorantka stwierdziła nieznaczne obniżenie odporności korozyjnej w przypadku stopu anodowanego. Ważnym osiągnięciem tej części badań jest wykazanie odporności na korozję wżerową stopu Ti13Nb13Zr.

Doktorantka opracowała szereg metod wytwarzania regularnych nanostruktur tlenkowych, co wykazała zwłaszcza w publikacjach D1, D3, D5 oraz D8. Badania strukturalne otrzymywanych materiałów przeprowadzone zostały metodą dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego, głównie przy użyciu techniki stałego kąta padania (*GIXD – grazing incidence X-ray diffraction*), co pozwoliło na uzyskanie informacji o strukturze powierzchni. Morfologię próbek zbadano metodą skaningowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W pracy D7 Doktorantka przedstawiła liniową korelację pomiędzy napięciem anodowania i rozmiarem utworzonych nanorurek. Należy zaznaczyć, że tego typu zależności mogą być

wykorzystane do wytwarzania nanostrukturalnych tlenków o pożądanej morfologii. Istotnym osiągnięciem są nanostruktury opisane w pracy D3 przedstawiającej warunki otrzymywania nanorurek o stosunkowo małej średnicy, tj. około 10-30 nm. Jest to ważne osiągnięcie, ponieważ w innych badaniach wykazano znaczną biokompatybilność nanorurek o średnicy około 15 nm. W badaniach prowadzonych metodą spektroskopii impedancyjnej Doktorantka wykazała większą odporność korozyjną względem niemodyfikowanej warstwy stopu Ti13Nb13Zr, co zostało opisane w publikacji D4. Wysoko należy ocenić badania potencjału elektrokinetycznego nanostruktur tlenkowych, które Dyplomantka prowadziła w roztworach KCl, PBS i sztucznej krwi. Pomimo trudności eksperymentalnych i teoretycznych w ustaleniu rzeczywistego potencjału zeta ze względu na geometrię układu i obecność wąskich kanałów wewnątrz nanorurek, opisane względne zmiany efektywnego potencjału zeta dostarczają niezwykle cennych informacji dotyczących grup funkcyjnych obecnych na powierzchni tlenków, co jest bardzo istotne z punktu widzenia biokompatybilności warstwy.

W pracach D8 Doktorantka opisała metodę otrzymywania nanorurek 3G, oraz wyniki badań mikrotwardości metodą Vickersa dla stopu Ti13Nb13Zr przed i po anodowaniu. Dyplomantka wykazała związek twardości z parametrami morfologicznymi nanorurek. W przypadku nanorurek 1G, Doktorantka zaobserwowała wzrost mikrotwardości względem niemodyfikowanego stopu, wykazując tym samym możliwość celowej kontroli mikrotwardości poprzez dobór morfologii nanorurek. Należy przy tym podkreślić, że mikrotwardość może być istotnym parametrem do oceny potencjalnej integralności tkanki kostnej. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, że nanostrukturalne warstwy tlenkowe na powierzchni stopów Ti13Nb13Zr mogą eliminować naprężenia implant-kość. W pracy D8 Doktorantka wykazała również możliwość całkowitego wyeliminowania hemolizy. Należy przy tym podkreślić, że pracę D8 opublikowano w 2017 roku w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania w renomowanym wydawnictwie *Elsevier*, a opisane w niej wyniki zostały już docenione przez międzynarodowe środowisko naukowe, o czym świadczy duża liczba cytowań, która na dzień sporządzenia recenzji wynosi 31.

Badania mikrotwardości kontynuowane były również w pracy D9, w której zostały uzupełnione o badania biotribologiczne. Ważnym osiągnięciem tej części badań jest wykazanie silnego wpływu morfologii nanostruktur tlenkowych na zużycie biotribologiczne otrzymanych warstw.

Kompleksowe badania fizykochemiczne oraz biologiczne wytworzonych nanostruktur na powierzchni stopów opisano w pracy D10. Za pomocą spektroskopii fotoelektronów wybijanych promieniowaniem rentgenowskim (XPS) wyznaczono skład i naturę chemiczną

nanostrukturalnej warstwy tlenkowej. Poza tlenkiem tytanu wykazano obecność tlenków tytanu(IV), niobu(V) i cyrkonu(IV), pomimo że metale te wykazują znacznie mniejszą tendencję do tworzenia tego typu struktur. Na podkreślenie zasługują przeprowadzone badania aktywności biologicznej modyfikowanych stopów, zwłaszcza badania cytotoksyczności, trombogenicności i hemokompatybilności. Przeprowadzone badania wykazały brak efektów hemolitycznych otrzymanych nanostruktur. Stwierdzono również wpływ morfologii nanostruktur tlenkowych na trombogenicność warstw. W pracy opisano również wstępne wyniki badań dotyczące transportu leków. Analiza porównawcza profilu uwalniania Ibuprofenu dla badanych warstw nanorurek tlenkowych również wykazała zależność od morfologii warstw. Wykazano tym samym, że otrzymane nanostruktury mogą stanowić potencjalny nośnik substancji leczniczych w systemach kontrolowanego uwalniania leków.

#### *Uwagi i komentarze do pracy*

Recenzowana rozprawa doktorska jest w moim przekonaniu napisana starannie, jednak podobnie jak w innych obszernych opracowaniach pisemnych nie jest całkowicie pozbawiona pewnych uchybień. W przewodniku, na stronie 25 powinno być „moduł Younga” zamiast „moduł Young’a”, analogicznie powinno być „Vickersa” (str. 71) oraz „Ringera” na stronie 74 opracowania.

Na stronie 30 doktorantka użyła niefortunnego sformułowania „nierozpuszczalnych kompleksów  $[\text{TiF}_6]^{2-}$ ” – zapewne chodziło o rozpuszczalne, a nie nierozpuszczalne sole zawierające jony kompleksowe  $[\text{TiF}_6]^{2-}$ .

Problematyczne jest zamieszczenie dwóch niezależnych spisów cytowanej literatury, tj. na stronach 37 – 43 oraz na stronach 83 – 86. Powoduje to niepotrzebne dublowanie poszczególnych pozycji literaturowych, np. 1/30; 20/19, 42/15, 17/11 z obu spisów. Ponadto niektóre z pozycji literaturowych pojawiają się dwukrotnie także w ramach jednego spisu, np. odnośniki 5/32; 12/15; 25/33; 44/57 48/56 w pierwszym spisie literatury.

W pracy D3 przedstawiono nieprawidłowy zapis równania reakcji (1) – brak bilansu ładunku. W pracy D7 również znajduje się nieprawidłowy zapis równań reakcji chemicznych (1) oraz (2) – brak bilansu masy i ładunku. Z kolei w równaniu reakcji (5) zapisano reakcję redukcji podając produkty utlenienia.

Znaczne obniżenie potencjału korozji w przypadku anodowanego stopu, opisane w pracy D2, wydaje się być dość zaskakujące. Czy efekt ten nie jest związany z obecnością jonów fluorkowych w nanostrukturalnej warstwie tlenkowej? O obecności jonów fluorkowych dla innych warstw tego typu, może świadczyć również silny wpływ jonów wapnia na potencjał

zeta nanostruktur tlenkowych. Ze względu na toksyczność jonów fluorkowych ciekawe byłoby porównanie wyników dla nanorurek tlenkowych wytworzonych w elektrolitach niezawierających jonów fluorkowych – tzw. nanorurki czwartej generacji. Wyeliminowanie toksycznego kwasu fluorowodorowego miałyby również bardzo korzystny wpływ na potencjalne wdrożenie opracowanych metod modyfikacji biomateriałów.

W publikacji D1 w badaniach metoda dyfrakcji GIXD stwierdzono obecność fazy rutylu jednak na przedstawionym dyfraktogramie brak najbardziej intensywnych linii dyfrakcyjnych tej fazy dla kątów  $2\theta$  wynoszących  $27,5^\circ$ ;  $36,16^\circ$  oraz  $54,3^\circ$  pochodzących od płaszczyzn (110), (101) oraz (211). Z kolei na dyfraktogramie w pracy D3 zidentyfikowano również obecność rutylu, na podstawie refleksu (110), który występuje jednak przy nieco wyższych kątach  $2\theta$ . Uwagę zwraca również znacznie mniejsze poszerzenie tego refleksu względem refleksów pochodzących od podłoża, spodziewany byłby raczej efekt odwrotny, tj. zwiększenie szerokości połówkowej sygnałów refleksów pochodzących od nanostrukturalnej warstwy tlenkowej. Nie jest też jasne czy i ewentualnie w jaki sposób mikrostruktura podłoża wpływa na morfologię i wzrost nanorurek.

W pracach D1 i D2, na podstawie badań dyfrakcji rentgenowskiej Doktorantka stwierdziła obecność fazy  $TiO_3$ , którą to fazę zaliczyła do tlenków tytanu. Jest to określenie nieprawidłowe, ponieważ sugerowałoby występowanie w tym związku tytanu na +VI stopniu utlenienia. Struktura fazy  $TiO_3$  nie jest jasna i nie była także dyskutowana w pracy.

Doktorantka prowadziła badania dla stopu  $Ti_{13}Nb_{13}Zr$ , co w dużej mierze stanowi o wartości pracy. Jestem jednak ciekawy na ile możliwa byłaby próba uogólnienia zaobserwowanych zależności i wniosków również na inne stopy na bazie tytanu.

#### *Podsumowanie i wnioski końcowe*

Praca doktorska mgr inż. Agnieszki Stróż dotyczy ciekawych i ważnych zagadnień dotyczących praktycznego zastosowania metod elektrochemicznych w celu poprawy biofunkcjonalności stopów na bazie tytanu. Przedstawione uwagi krytyczne, mające w dużej mierze charakter drobnych uchybień czy dyskusji naukowej, nie umniejszają wysokiej oceny pracy. Podsumowując osiągnięcia Doktorantki należy stwierdzić, że opiniowana praca doktorska obejmuje szeroki wachlarz powiązanych ze sobą problemów o charakterze interdyscyplinarnym. Nakreślony ambitny plan badawczy został w znacznym stopniu zrealizowany. Do najważniejszych osiągnięć naukowych oraz rozwiązań o charakterze nowatorskim, które w mojej ocenie mają istotne znaczenie dla rozwoju realizowanej tematyki badawczej należy zaliczyć:

1. Opracowanie szeregu warunków eksperymentalnych otrzymywania wysoce uporządkowanych nanorurek tlenkowych o zróżnicowanej morfologii, a zwłaszcza wyznaczenie liniowej korelacji pomiędzy średnimi wymiarami nanorurek 3G i napięciem anodowania. Zależności te mogą być stosowane do otrzymywania nanorurek o założonych parametrach morfologicznych (ang. *tailored materials*).
2. Wykazanie silnego wpływu wytworzonej warstwy tlenkowej na właściwości mikromechaniczne i biotribologiczne oraz, co istotne – znalezienie korelacji pomiędzy mikrotwardością i odpornością na zużycie biotribologiczne otrzymanych warstw w zależności od morfologii nanorurek. Korelacja ta może zostać wykorzystana w praktyce klinicznej w celu eliminowania niepożądanego naprężenia implant-kość.
3. Nowatorskie zastosowanie metody lokalnej spektroskopii impedancyjnej w badaniach korozji wżerowej stopu Ti13Nb13Zr, oraz określenie wpływu nowoopracowanych warstw tlenkowych na mechanizm i kinetykę korozji stopu w roztworach symulujących środowisko biologiczne. Wykazanie odporności na korozję wżerową badanego stopu.
4. Badania aktywności biologicznej modyfikowanych stopów, zwłaszcza badania cytotoksyczności, trombogenności i hemokompatybilności. Określenie warunków wytwarzania oraz wykazanie biozgodności modyfikowanego stopu Ti13Nb13Zr polegającej na wyeliminowaniu efektów hemolitycznych i spełnieniu wymagań do zastosowań klinicznych stopu otrzymanego metodą anodowania do wytworzenia warstw NT 3G.
5. Powiązanie profilu uwalniania Ibuprofenu z morfologią badanych nanostruktur tlenkowych. Wykazanie, że otrzymane warstwy nanostrukturalnych tlenków mogą stanowić potencjalny nośnik substancji leczniczych w systemach kontrolowanego uwalniania.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania odpowiednich przepisów prawnych i zwyczajowych stawianych pracom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Stróż do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę poziom prezentowanych wyników i ich interdyscyplinarny charakter, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

