

Prof. dr hab. inż. Jan Marciniak, prof. zw. P.Ś
Katedra Biomateriałów i Inżynierii Wyrobów Medycznych
Wydział Inżynierii Biomedycznej
POLITECHNIKA ŚLĄSKA

ul. Gen. de Gaulle'a 72
41-800 Zabrze

e-mail: jan.marciniak@posl.pl
tel. (032) 277 7422

Zabrze, 2013-07-15.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Maksymow pt.: „*Modyfikacja powierzchni biomateriałów przeznaczonych do terapii układu krążenia*” zrealizowanej pod kierunkiem prof. dra hab. inż. Bogusława Majora.

Recenzja pracy została wykonana na zlecenie Dyrektora Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie prof. dra hab. inż. Pawła Zięby i uchwały Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN w Krakowie z dnia 06 czerwca 2013 roku.

1. Ocena oryginalności problematyki i poprawności założeń badawczych rozprawy

Choroby niedokrwienne serca stanowią dominantę w schorzeniach cywilizacyjnych i w statystyce śmiertelności. Przykładowo każdego roku w W. Brytanii choroba niedokrwienna serca powoduje śmierć ok. 180 tys. osób i ok. 500 tys. w USA. W statystyce krajowej jest przyczyną ok. 47% zgonów, których przyczyną są choroby układu krążenia w tym ok. 13% niedokrwienna serca. Niepokojąco też rośnie liczba z tymi dolegliwościami osób w średnim wieku osiągająca ok. 40%.

W rozwiązaniu tych problemów uczestniczą już zespoły interdyscyplinarne z obszaru inżynierii biomedycznej i klinicznej. Doskonalenie metod związane jest z doskonaleniem diagnostyki schorzeń układu krążenia nieinwazyjnymi technikami obrazowania oraz technikami interwencyjnymi – wszczepiania pomostów aortalno – wieńcowych i przeszskórnego poszerzania naczyń wieńcowych w sytuacjach dużej niewydolności stosowania komór wspomagania serca lub protez serca. Te metody są konieczne, gdy wyczerpują się możliwości poprawy jakości dokrwienia poprzez zmianę stylu życia oraz leczenia farmakologicznego.

Wśród technik przeszskórnego poszerzania naczyń wieńcowych wyróżnia się te, które nie powodujące istotnej zmiany objętości blaszki miażdżycowej – przeszskórną angioplastykę wieńcową (PTCA) i wszczepienie implantów w postaci stentów wieńcowych lub też

zastosowania metody, która spowoduje zmniejszenie objętości blaszki miażdżycowej – aterektomii kierunkowej lub wysokoobrotowej czy angioplastyki laserowej.

Od roku 1977 metoda przezskórnej angioplastyki wieńcowej budzi duże zainteresowanie badaczy. Przykładowo w roku 2012 wykonano w Polsce już ponad 100 tys. zabiegów implantacji stentów wieńcowych. W leczeniu krytycznej niewydolności serca z kolei wszczepiane są systemy wspomaganie serca. W doświadczeniach klinicznych w kraju z zastosowania systemu pozaustrojowych komór wspomaganie serca skorzystało 280 osób.

Problemy wynikające z zastosowania implantów i urządzeń wspomagających pracę serca wymagają więc ciągłej weryfikacji ich cech użytkowych na bazie systematycznie i wnikliwie prowadzonych obserwacji klinicznych. Kwestie te sprowadzają się oceny przydatności postaci konstrukcyjnych tych wyrobów, stosowanych biomateriałów głównie metalowych i polimerowych, a w szczególności ich własności mechanicznych, fizykochemicznych i biologicznych modyfikowanych warstw powierzchniowych. Uwzględniona też musi być technika implantowania i konsekwencje zmian warstwy powierzchniowej rzutujące na skutki pozabiegowe i długotrwałe. W tę ocenę w kalkulowana jest przydatność kompozycji materiałowych czy też skuteczności obrazowania po implantacji. Rozwiązanie wymienionych dylematów tkwi w rozpoznaniu mechanizmów wykrzepiania krwi i restenozy, rozpatrywanych w warunkach statycznych i dynamicznych.

W tym obszarze prowadzone są intensywne badania w czołowych ośrodkach kardiologii i bioinżynierii na świecie. Również w Polsce w ramach programu „Polskie Sztuczne Serce” sponsorowanego przez NCBiR, a koordynowanego przez Fundację Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze, w którym mam przyjemność uczestniczyć jako recenzent, piętnaście krajowych ośrodków naukowych i zagranicznych prowadzi badania. Przeważającą grupę badawczą stanowią czołowe, krajowe ośrodki inżynierii biomateriałów, których prace koordynowane są przez prof. Bogusława Majora z Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN w Krakowie.

W zakresie badań własności fizykochemicznych warstw powierzchniowych implantów kardiologicznych powinny być zdefiniowane kryteria, które uwzględniamy w odniesieniu do zastosowań w układzie sercowo-naczyniowym. Kryteria oceny obejmują: identyfikację podłoża biomateriału - skład chemiczny i fazowy warstwy wierzchniej czy powłoki z ukazaniem profili wglębnych stężenia pierwiastków, grubość warstwy, chropowatości topografia powierzchni, zwilżalność powierzchni (hydrofilność lub hydrofobowość) istotna w rozważaniu wykrzepiania, wielkość energii swobodnej powierzchni, adhezja warstwy do podłoża przy cyklicznie zmiennych obciążeniach, odporność korozyjna dopasowana do zastosowania funkcjonalnego (typ korozji: wżerowa,

szczelinowa, naprężeniowa lub zmęczeniowa) z determinacją roztworu modelowego, pH i temperatury, ocena uwalniania jonów z powierzchni, twardości i odporności na ścieranie, adhezja i podatność warstwy do odkształceń oraz badanie reaktywności, a więc oznaczenie reakcji katalitycznych wskazujących potencjalne własności antybakteryjne dla warstwy optymalnej pod względem fizykochemicznym szczególnie po sterylizacji. Na podstawie uzyskanych finalnych wyników oceny biologicznej, własności mechanicznych i fizykochemicznych ilość proponowanych badań czy metod można dopiero ograniczać do niezbędnych i najistotniejszych.

Metody, które w świetle prowadzonych aktualnie badań kwalifikują się do wiarygodnej i precyzyjnej oceny biologicznej biomateriałów o zmodyfikowanych powierzchniach do kontaktu z krwią dotyczą: zakrzepicy, krzepnięcia, oceny płytek i ich funkcji, parametrów hematologicznych i układu immunologicznego. Najczęściej są ujmowane wyniki badań z zakresu oceny: kąta zwilżania na podłożu biomateriału, adsorpcji białek osocza, adhezji płytek krwi, morfologii krwi, agregacji płytek w pełnej krwi, aktywacji płytek w pełnej krwi, powstawania biofilmu bakteryjnego, proliferacji komórek śródbłonna i ekspresji genów cyklu komórkowego oraz proteomu komórek śródbłonna. Analizowanymi parametrami są także: spadek liczby płytek we krwi po działaniu sił ścinających, przyrost liczby agregatów płytkowo-płytkowych, udział odsetkowy dużych i małych agregatów płytkowych złożonych z dwóch lub więcej płytek, stopień aktywacji płytek mierzony pojawieniem się na ich powierzchniach Selektyny P, aktywnej konformacji receptora IIb/IIIa mierzonej przeciwciałem PAC-1. Cytowane rodzaje badań są bardzo skomplikowane i wymagają specjalistycznej aparatury i doświadczeń badaczy.

Na tle wymienionych i rozwijanych badań w ośrodkach krajowych i zagranicznych praca doktorska mgr inż. Katarzyny Maksymow nawiązuje do istotnych problemów z zakresu kształtowania kompozycji materiałowych z oceną ryzyka powikłań. Praca została ukierunkowana na istniejące potrzeby, ma swoją rację celowości i wypełnia luki w tym zakresie w problematyce badawczej inżynierii biomateriałów i powierzchni do zastosowań w układzie sercowo-naczyniowym.

2. Ocena merytoryczna i uwagi dotyczące rozprawy

Praca obejmuje 114 stron, w tym 64 rysunki i 16 tabel. Praca tradycyjnie podzielona została na dwie części – studium literaturowe i badania własne Doktorantki. Całość rozprawy

nawiązuje do 183 pozycji literaturowych i obowiązujących nawiązujących do publikacji ostatnich lat.

Rozprawę rozpoczyna wstęp, w którym Doktorantka rozważyła celowość prowadzenia badań z zakresu poprawy jakości fizycznych, fizykochemicznych oraz biologicznych biomateriałów na implanty w układzie sercowo-naczyniowym poprzez wytwarzanie powłok z udziałem węgla diamentopodobnego, tytanu, azotku tytanu i dwutlenku tytanu na podłożu polichlorku winylu lub hodowlę komórek śródbłonna i mięśniówki na podłożach o zmodyfikowanej topografii. Wyeksponowana została możliwość otrzymywania powierzchni implantów o skutecznych właściwościach antytrombogennych.

W części studialnej Doktorantka przeanalizowała i zsyntetyzowała istotne zagadnienia fizykochemiczne układu sercowo-naczyniowego, z których wynikają przesłanki do determinowania własności fizykochemicznych implantów kardiologicznych.

W rozdziale 2.1 Doktorantka eksponuje trudności badawcze w obszarze biomateriałów do kontaktu z krwią, a mianowicie stosowanie do badań krwi zwierzęcej nie daje rezultatów adekwatnych do uzyskiwanych na krwi ludzkiej. Krew ludzka od różnych dawców jest zróżnicowana cechami wykrzepiania. Testy dynamiczne mogą być różnicowane warunkami przepływowymi, a więc są nieporównywalne, a czas wykonywania testów nie może przekraczać 4 godzin, optymalnie do 30 min. Są to dylematy komplikujące prowadzenie badań materiałoznawczych.

Doktorantka wnikliwie przedstawiła aktualny stan wiedzy z zakresu biokompatybilności, akcentując trudności w jednoznacznym zdeterminowaniu kryteriów oceny jakości powierzchni implantów do kontaktu z krwią i zbyt ogólnych procedur oceny biologicznej wynikających z normy ISO 10993. W rozważaniach dotyczących cech składników morfotycznych krwi wyróżnione zostały leukocyty, trombocyty, osocza i jego składniki – albumina, globulina i fibrynogen. Są to najczęściej eksponowane przez badaczy składniki morfotyczne krwi. Wiadomo, że w ocenie morfologii specyficznych składników jest więcej. Przykładowo w ocenie erytrocytów wyróżniamy MCV – średnia objętość krwinki czerwonej, MCH – przeciętna zawartość hemoglobiny we krwi, MCHC – przeciętne stężenie hemoglobiny w krwi, obraz krwinek białych wg Schylinga – postać krwinek, leukocyty T i B oraz monocyty. Z kolei zaburzenia w układzie krzepnięcia bazują na testach Quicka, testach generacji tromboplastyny, czasu trombinowego, oznaczeniu poziomu antytrombiny III i oznaczeniu białka C i S.

Doktorantka rozważa w rozdziale 2.3 syntetycznie zagadnienia hemostazy z uwypukleniem procesu krzepnięcia, oddziaływania biochemicznego powierzchni biomateriału z krwią z wyróżnieniem cech fizycznych podłoża – napięcia powierzchniowego. Analizy odnoszą się głównie do procesów biochemicznych w mniejszym stopniu do

zagadnień biofizycznych. Kolejno w rozdziale 2.5.2. Doktorantka eksponuje bezpieczeństwo biologiczne materiału i urządzeń do kontaktu z krwią i bazując na pracach Ratnera determinuje niepożądane zjawiska dotyczące procesu hemolizy, powstawania skrzeplin oraz rozwoju infekcji oraz stanów zapalnych w stadiach początkowych i po dłuższym okresie z uwzględnieniem dekohezji, agregacji i tworzenia zatoru i jego rozprzestrzeniania. Na tym tle eksponowane są także osiągnięcia profesorów T. Wierzchnia i E. Czarnowskiej dotyczące powierzchni stopów tytanu. Nie uwzględnione zostały w tych rozważaniach kwestie energii powierzchniowej, wielkości i rozmieszczenia ładunku elektrostatycznego istotnych dla podłoża polimerowego lub obecności wolnych grup anionowych na jego powierzchni i wielkości powierzchniowej przewodności oraz zmniejszenia potencjału elektrycznego na powierzchni styku biomateriał –przepływający elektrolit. W rozdziale tym bardzo szczegółowo opisany został proces hemostazy zarówno pod względem biochemicznym i morfologicznym, jak też czynników dynamicznych hamujących aktywizację, adhezję, agregację i uwalnianie płytek z uwypukleniem warunków przepływowych. W kwestii dotyczącej hemolizy Doktorantka rozważała także najnowsze rezultaty badań dotyczące udziału naprężeń ścinających i prędkości ścinania. Te kwestie są istotne w rozważaniach destrukcyjnych czerwonych krwinek i powstawania skrzepu przy formułowaniu własności fizykochemicznych powierzchni biomateriałów przeznaczonych do kontaktu z krwią.

Na tle tych rozważań dotyczących mechanizmów wykrzepiania i czynników aktywizujących ten proces został wyeksponowany i przedstawiony w kolejnym rozdziale 2.6 dotyczącym strategii wytwarzania hemokompatybilnych warstw i powłok. Rozważając hemostazę doktorantka dobrze wyeksponowała proces wykrzepiania w warunkach statycznych, jak i turbulentnych przy wysokich naprężeniach ścinających, stwierdzając, że w mechanizmach wykrzepiania istotną rolę odgrywają naprężenia ścinające i prędkość narastania ciśnienia, turbulencja przepływu oraz destrukcja krwinek w kontakcie z implantem.

Bardzo szczegółowo przeanalizowana została przez Doktorantkę w rozdziale 2.6 problematyka nazwana cyt. „Strategia wytwarzania hemokompatybilnych pokryć” z ekspozycją właściwości hematokompatybilnych biomateriału. Bardzo szczegółowo rozważono techniki modyfikacji powierzchni implantów. Słuszny wniosek z analizy studialnej, że do kształtowania własności użytkowych biomateriałów do kontaktu z krwią powinno się bazować na w pełni rozpoznanych własnościach naturalnego podłoża naczyń i reakcji składników morfotycznych z podłożem z uwypukleniem procesu wykrzepiania. Na tle aktualnego stanu wiedzy kwestie te nie zostały w pełni wyjaśnione i udokumentowane, co utrudnia zbudowanie modelu badawczego adekwatnego do obiektu rzeczywistego. Wiele czynników jest zmiennych dynamicznie i posiada znamiona cech osobniczych. Doktorantka akcentuje także znaczenie miejsca i techniki implantacji oraz stochastykę związaną

z cechami osobniczymi pacjenta i zażywanymi środkami farmakologicznymi. Determinując cechy użytkowe implantów do kontaktu z krwią Doktorantka wymienia je wg Williamem w tab. 2.3 i 2.4. Wiele z nich nie jest zdeterminowanych i budzi wątpliwości na tle prowadzonych rozważań.

Bardzo cenne i oryginalne są rozważania Doktorantki dotyczące zwilżalności i energii powierzchniowej oraz ładunku powierzchniowego, które są przez wielu badaczy pomijane. Wiadomo, że składniki morfologiczne krwi, jak i powierzchnie naczyń krwionośnych wykazują magnetotropizm i własności elektryczne, decydujące o szybkości rekombinacji rodników przy przejściach z dia- w paramagnetyzm surowicy ludzkiej. Już analiza matematyczna Blumersona pozwoliła ustalić ilościowe relacje adhezji komórek na powierzchni metali z uwagi na efekty elektrostatyczne. Kolejne prace Sawyera ukazują na powierzchni naczyń ładunki ujemne i również składników krwi, które decydują o powstaniu zakrzepów. Leki także wpływają na ten proces, przykładowo heparyna obniża potencjał powierzchniowy ścianek, protonina zwiększa. Wzrost potencjałów powierzchniowych na powierzchni metali zmniejsza tendencję do zakrzepów. Ogólnie powierzchnie biomateriałów powinny cechować się własnościami dielektrycznymi lub półprzewodnikowymi zbliżonymi do własności komórek.

Na str. 22 Doktorantka stwierdza cyt. „duża siła jonowa w fizjologicznym środowisku i szybkie wytworzenie równowagi jonowej powoduje, iż elektryczne właściwości powierzchni nie odgrywają znaczącej roli w formowaniu początkowych warstewek białek oraz późniejszej adhezji”. W pracach Sawyera wykazano, że przy potencjach o powierzchni zakrzep formował się przez 3 lata, natomiast przy potencjałach +100 do +300 mV zakrzep powstał po 7 dniach kontaktu. Więc te relacje są dyskusyjne.

W rozdziale 2.6.2 Doktorantka dosyć wnikliwie przeanalizowała techniki stosowane do modyfikacji powierzchni biomateriałów głównie pod kątem inżynierii tkankowej, wyróżniając metody modyfikacji podłoża oraz powłoki niekonwalencyjne i kowalencyjne. Omówione zostały poszczególne metody pod względem warunków procesów i przeanalizowano przebieg zjawisk oraz przydatności warstw wierzchni do różnych zastosowań funkcjonalnych. Doktorantka krytycznie ustosunkowała się do zastosowania poszczególnych metod kształtowania warstw przydatnych do kontaktu z krwią. To studium świadczy o dobrej znajomości Doktorantki problematyki inżynierii biomateriałów. Na tym tle eksponowane są nowatorski metody wykorzystywane w rozprawie doktorskiej.

Analizując problematykę materiałów implantacyjnych zacytowano zestawy biomateriałów wg Williamsa. Tu jednak należało krytycznie ocenić jego propozycje aplikacji – tab. 2.6 str. 31. Z kolei w zestawie klinicznych materiałów do kontaktu z krwią należało także uwzględnić biopolimery (kolageny, fibrynogeny i chitynę) oraz polielektrolity – hydrożele o usieciowaniu

jonowym elektroujemnym lub elektrododatnim. Ich własności są korzystne do procesu heparynizacji. Osadza się je zarówno sposobem chemicznym, jak i radiacyjnego wszczepiania monomerów hydrofilowych na podłoże biomateriału. Modyfikacja powierzchni hydrożelami przybliżyła jej własności fizykochemiczne do naturalnego śródbłonka i ułatwione są przez to procesy regeneracyjne w protezowanych częściach układu krwionośnego, co stwarza warunki do samoregulacji procesu krzepnięcia krwi w sposób zbliżony do zachodzącego w naczyniu nieuszkodzonym. Ogólnie rozdział 2.7.1. dotyczący powłok nieorganicznych został opracowany stosownie i ukazuje rezultaty badań nad modyfikacją powierzchni powłokami o różnym składzie chemicznym oraz wyeksponowane zostały na kanwie aktualnego stanu wiedzy o procesach wykrzepiania własności biomateriału wymagane do kontaktu z krwią.

Rozdział 2.8 dotyczy wpływu topografii podłoża na reakcje i funkcje komórek śródbłonka. Doktorantka przeanalizowała zagadnienia wpływu jakości podłoża na proliferację komórek adhezję do podłoża z uwagi na bodźce biofizyczne, chemiczne i biochemiczne kształtujące finalną morfologię komórek. Uwypuklone zostały mechaniczne własności, ale pominięto zdeterminowanie konkretnych cech oddziaływania mechanicznego, dotyczącego adhezji na bazie wzajemnego oddziaływania podłoża z komórkami, a więc udziału sił van der Waalsa, wiązań chemicznych oraz wielkości sił i energii wiązania.

W rozważaniach Doktorantki dotyczących morfologii i adhezji komórkowej wskazano, że morfologia niezależnie od biomateriału podłoża determinuje topografię powierzchni, która decyduje także o adhezji. Doktorantka wskazuje jednak na istniejące braki w zakresie badań podstawowych wyjaśniających zależność morfologii i adhezji komórek do podłoża biomateriału. Wskazuje na konieczność uwzględnienia sygnałów chemicznych, rodzaju wiązań molekularnych, podatność podłoża do odkształceń i obecność pola elektrycznego. Badania Uttayarata [123] i Bhata [129] wykazały związki i kierunki rozwoju komórek od topografii powierzchni i podatności do odkształceń nie odnosząc się jednak do morfologii komórek. Zdaniem Doktorantki nie wyjaśniony został problem reakcji zapalnych komórek i ich związku z migracją.

W ostatnim podrozdziale Doktorantka nawiązuje do badań Wolff'a dotyczących funkcjonalnej adaptacji kości ujmujących zasady remodelingu związanego z kierunkiem naprężeń głównych. Jego badania dotyczą zmian gęstości tkanki kostnej i zakładają, że prędkość przyrostu masy tkanki jest funkcją tensora odkształceń, a prędkość zmian masy tkanki jest proporcjonalna do zmian odkształceń. Późniejsze prace Basseta, Eriksona, Barkera, Covina i innych ukazują zależność odkształcenia i inicjowania sygnałów elektrycznych od stymulacji komórek i decydują o przebudowie kości. Więc efekty elektromechaniczne (piezoelektryczne i elektrokinetyczne decydują o aktywizacji

metabolicznej. Efekty komórkowe związane na tym gruncie zależą także od zjawisk elektromechanicznych, a mianowicie błony komórkowe zmieniają m.in. przepuszczalność w wyniku zmian potencjałów kanałów jonoselektywnych sterowanych różnicą potencjałów. Szkielet cytoplazmatyczny organelli komórkowych posiada ładunek powierzchniowy, a także może modyfikować poruszanie się wewnątrz komórkowych przekaźników informacji (np. jonów Ca), pod wpływem pola elektrycznego zmienia się wzmożona produkcja RNA w jądrze komórkowym i następuje synteza DNA/RNA.

W tych rozważaniach Doktorantka wykazała dobrą znajomość propozycji technologicznych kształtowania kompozycji biomateriałów kardiologicznych. Na tym tle zaznacza się dojrzałość Doktorantki i umiejętność krytycznej oceny jakości finalnej biomateriałów na tle zaleceń obowiązujących normie ISO 10933.

Bardzo pozytywnie oceniam fakt, że Doktorantka przeanalizowała także badania prowadzone w kraju w ramach projektu „Polskie Sztuczne Serce”, które wniosły szereg nowych rozwiązań i informacji poznawczych dotyczących zagadnień biomechanicznych i materiałowych przydatnych do zastosowań aplikacyjnych. Praca ta ma ścisły związek z prowadzonymi badaniami w tym programie.

Studium literaturowe kończą sugestie, w których Doktorantka umiejętnie na tle rozpatrywanych zagadnień cząstkowych sformułowała nierozwiązane w pełni problemy i uzasadniła własne koncepcje badawcze związane z perspektywnymi kierunkami badań rozwojowych. Zagadnienia te nawiązują do aktualnego stanu wiedzy i doświadczeń klinicznych oraz możliwości technicznych. Na tym tle uzasadniona została koncepcja propozycji badawczych rozwijana w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Podsumowując część studialną pracy Doktorantka przeanalizowała i umiejętnie zsyntetyzowała istotne zagadnienia fizykochemiczne i biochemiczne, łącząc poziom submolekularny z procesami bioelektronicznymi, które powinny być uwzględniane przy modyfikowaniu powierzchni biomateriałów do kontaktu z krwią.

W rozdziale 3 sformułowana została teza i cel pracy ukierunkowane na materiały warstwowe wytwarzane metodami fizycznymi i chemicznymi na podłożu polimerowym o dobrej hemozgodności w kontakcie z krwią. Postawiona teza może wydawać się dyskusyjna i wskazywać, że opracowane zmodyfikowane powierzchniowo materiały mogą być stosowane w terapii układu krążenia. Raczej są stosowane na implanty lub elementy komór wspomagania serca. Warstwa może być stosowana w terapii, jeżeli stanowi nośnik uwalnianych leków. Definicja sformułowana przez Williama w monografii „Definitions in Biomaterials” z roku 1987 cyt. „Biomateriał to substancja inna niż lek lub kombinacja substancji syntetycznych lub naturalnych, która może być użyta w dowolnym czasie jako część lub całość systemu, zastępując tkankę lub organ, bądź spełniać jego funkcje”.

W rozdziale 4 omówiono dobór materiałów do badań, a więc polichlorek winylu stosowany na elementy naczyniowe oraz płytki krzemowe stosowane do testów diagnostycznych. Na podłożach tych wytwarzano powłoki z udziałem Ti i C metodą hybrydową za pomocą rozpylania magnetronowego z udziałem ablacji laserowej. Natomiast wewnętrzne powierzchnie rurowe pokrywane były powłoką za pomocą techniki jarzeniowej z modyfikacją powierzchni za pomocą impulsów laserowych.

W rozdziale 4.2. uzasadniono dobór metod badawczych nieodzownych do struktury materiału (mikroskopia sił atomowych, skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa), własności mechanicznych (podatność do odkształceń, odporność powłok na zarysowanie, współczynnik tarcia, siłę tarcia, wielkość obciążenia, głębokość ścieżki i emisję akustyczną) oraz zwilżalność i energię powierzchni.

Niezwykle szeroki zakres badań przeprowadziła Doktorantka w zakresie oceny biogodności. Zastosowane metody uznać należy jako nowatorskie i wykraczające poza zalecane i obowiązujące w normie ISO 10933. Na wstępie oceniono wpływ metody i warunków sterylizacji - gazowa i plazmowa, odniesionych do materiału referencyjnego PCW. Moim zadaniem celowym byłoby sprawdzenia wybranymi testami stanu przed sterylizacją zmodyfikowanych powierzchniowo biomateriałów, gdyż można ujawnić zmiany wywołane tym procesem w strukturze i własnościach powłok.

Do oceny zmodyfikowanych biomateriałów po sterylizacji zastosowano metody fluorescencyjne z barwieniem jąder komórkowych, cytoszkieletu i elementów morfotycznych krwi za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Do obrazowania serii przekrojów optycznych na różnych grubościach powłok i żywych komórek w czasie rzeczywistym wykorzystany był mikroskop konfokalny. Prowadzona była także oryginalna i nowatorska hodowla komórek śródbłonna typui HUVEC. Obserwowano ich zachowanie na podłożach o zmodyfikowanej topografii, prowadząc analizę adsorpcji białek surowicy płodowej cielęcej.

Szczególnie nowatorskie metody zastosowała Doktorantka do analizy funkcji płytek krwi w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, które umożliwiają analizę adhezji i agregacji trombocytów w pełnej krwi wzbogaconej środkiem antykoagulacyjnym w warunkach przepływu aortalnego. Był to test Impact R. Z kolei do przeprowadzenia symulacji laminarnego przepływu aortalnego w elementach rurowych był zastosowany analizator oddziaływania biokinetycznego. Badania adhezji erytrocytów do powierzchni powłok przeprowadzono za pomocą testu promieniowego przepływu. W teście tym analiza adhezji prowadzona była z udziałem naprężeń ścinających. Z uwagi na nowatorskie metody i autorskie konstrukcje urządzeń Doktorantka bardzo skrupulatnie opisała procedury i parametry badawcze. Nie podane zostały jednak populacje próbek czy prób istotne do

statystycznych opracowań lub też walidacji metod. Efekty prowadzonych badań wymagały obrazowania mikroskopowego z wykorzystaniem dostępnych programów.

Rozdział 5 prezentuje wyniki badań interdyscyplinarnych. Wyniki badań zostały ogólnie prawidłowo zinterpretowane i udokumentowane. Można jednak dostrzec usterki, na które należy zwrócić uwagę w kolejnych pracach badawczych czy publikowaniu wyników, a mianowicie:

- na rys. 5.6, str. 61; wysokości nierówności dla różnych powłok zaznaczono tymi samymi kolorami, co utrudnia interpretację,
- str. 62; skąd wiemy, że naprężenia powodują pofałdowanie warstwy skoro nie były oceniane,
- str. 63; co oznacza modulowana struktura,
- str. 65; brak zestawienia wyników z testu zarysowania dla poszczególnych powłok porównawczo. Rys. 5.12 tej kwestii nie ilustruje. Są obawy, że podłoże polimerowe jest podatne do odkształceń pod wpływem zadawanych naprężeń i to może być przyczyną delaminacji powłoki w trakcie eksploatacji wyrobów finalnych i w konsekwencji zatorowości. Czy nie należało tej kwestii oszacować inną metodą badawczą niż test zarysowania ?
- str. 66; jak rozumieć, że adhezja komórek jest znacząco wysoka. Jakie zastosowano kryterium ? Na str. 71 są ilościowe relacje w postaci % udziału na powierzchni płytek i liczbie agregatów płytkowych, którą oceniano wizualnie – rys. 5.18, i 5.19. Czy to są kryteria ?
- str. 71; w ocenie biogodności wymieniane są fazy TiO_x lub TiO_2 . Która jest właściwa ? Ponadto wprowadzenie Si podwyższa energię powierzchniową i obniża kąt zwilżania. Doktorantka podała tę zależność odwrotnie.
- str.80; powłoki DLC(1), DLC(2) i SiO_x wytworzone na wewnętrznych powierzchniach rurowych cechują się karbowaną topografią powierzchni i dużą ilością pęknięć. Nie badano adhezji. Czy to oznacza, włączając wyniki testu Impact R, że są podatne do laminacji i wykrzepiania i nie nadają się do zastosowania ?

Na szczególną uwagę w rozprawie zasługują nowatorskie badania na przygotowaniu podłoża do wzrostu komórek prowadzące do odzwzorowania struktury naczynia krwionośnego. Jest to nowy kierunek badań rozwijany z udziałem inżynierii materiałowej. W pracy zastosowano podłoże krzemowe, którego powierzchnia była modyfikowana stosując ablację laserową, a więc różnicując kształt i odległości wytworzonych kanałów oraz studzienek po zasiedlanie komórkami śródbłonna i mięśniówki. Wytwarzano powłoki z udziałem C i Ti. Wykazano, że wprowadzenie do powłoki DLC krzemu pogarsza adhezję.

Korzystnie wpływa udział TiO_x w powłoce. Najkorzystniejsze własności uzyskano dla powłok DLC z udziałem Si i Ti metodą magnetronową.

Rozprawę kończy podsumowanie z dyskusją i wnioski końcowe. W dyskusji ujęto interdyscyplinarne zagadnienie ukierunkowane na zastosowanie najnowszych metod modyfikacji powierzchni biomateriałów do zastosowań funkcjonalnych jako biomateriały do kontaktu z krwią. Pod tym kątem ustawiony został program odpowiednich metod modyfikowania powierzchni i badań struktury i własności powłok z dominantą metod oceny biogodności, w tym oryginalnych do tej pory nie stosowanych w zalecenia normatywnym. Doktorantka w swoich rozważaniach metod inżynierii biomateriałów zawiera istotne problemy poznawcze, które rozważała w nawiązaniu do najnowszych prac badawczych z tego zakresu, ukazują krytycznie rezultaty prowadzonych badań. Moim zdaniem skromnie rozbudowano osiągnięcia aplikacyjne przydatne dla producentów wyrobów medycznych i do zastosowań klinicznych. W podsumowaniu ujęto w sposób klarowny kryteria oceny jakości finalnej powłok wytworzonych różnymi technologiami. Pod tym względem skromnie rozbudowane zostały także wnioski końcowe.

Stwierdzam, że rozprawa została napisana bardzo przejrzysto ze staranną i jakością edytorską oraz stosowana była właściwa terminologia w sferze zagadnień interdyscyplinarnych.

W pracy zauważyć można drobne usterki dotyczące zawężonej interpretacji wyników czy też dyskusji z rezultatami wyników innych autorów. Kwestie, które omówione zostały w dyskusji z Doktorantką nie obniżają wartości naukowej rozprawy. Powinny być jednak uwzględnione w dalszej pracy naukowej czy też przy publikowaniu wyników swoich badań.

Podsumowując należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zawiera cenne elementy poznawcze i utylitarne. Do niewątpliwych osiągnięć mgr inż. Katarzyny Maksymow należy:

- opracowanie technik wytwarzania powłok z fazy gazowej metodami fizycznymi o dobrej adhezji i biogodności i ustalenie korelacji pomiędzy strukturą powłok i własnościami fizycznymi oraz biogodnością, a także warunkami wytwarzania powłok,
- opracowanie oryginalnych i nowych metod badań własności biomateriałów do kontaktu z krwią, w szczególności oceny zgodności biologicznej,
- przeprowadzenie oryginalnych badań poznawczych z zakresu formowania podłoża biomateriału do zasiedlania komórek śródbłonna oraz mięśniówki jako perspektywnego materiału do kontrolowanego odwzorowania biologicznych funkcji naturalnej tkanki,

- włączenie do rozwiązywania trudnych i interdyscyplinarnych problemów różnych metod badawczych z kilku dyscyplin, np. z biomechaniki płynów, inżynierii biomateriałów, fizyki tkanek oraz umiejętne sformułowanie założeń badawczych oraz rozwiązanie określonych zagadnień naukowych i aplikacyjnych przydatnych inżynierii biomateriałów do układu sercowo-naczyniowego,
- krytyczna ocena wyników i określenie perspektywicznych kierunków badań.

3. Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z treścią recenzowanej rozprawy stwierdzam, że stanowi ona istotny przyczynek naukowy do opracowania technik wytwarzania powłok z fazy gazowej metodami fizycznymi o dobrej adhezji i biozgodności i ustalenia korelacji pomiędzy strukturą powłok i własnościami fizycznymi oraz biozgodnością, a także warunkami wytwarzania powłok do kontaktu z krwią. Rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Maksymow stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego zadania naukowego. Doktorantka wykazała ogólną wiedzę teoretyczną, w dyscyplinie „Inżynieria materiałowa” a także „Inżynierii biomedycznej” oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Recenzent stwierdza, iż przedstawiona praca doktorska odpowiada wymogom stawianym do uzyskania stopnia naukowego doktora nauk technicznych przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r (Dz.U.poz.595 z 2003 roku).

Wnioskuje o dopuszczenie do jej publicznej obrony przed Radą Naukową Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN w Krakowie.

