



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA  
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

## Wydział Inżynierii Metali i Informatyki Przemysłowej

**KATEDRA METALOZNAWSTWA I METALURGII PROSZKÓW**  
Centrum Mikroskopii Elektronowej dla Inżynierii Materiałowej

**Prof. dr hab. inż. Urszula Stachewicz**  
Tel. +48 12 617 52 30;  
e-mail: [ustachew@agh.edu.pl](mailto:ustachew@agh.edu.pl)  
website: <http://biocom4saven.agh.edu.pl/>

Kraków, 3 lipca 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”**

wykonanej w ramach doktoratu wdrożeniowego z firma Nano-implant Sp. Z o. o. na  
Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydziale Chemii, pod kierunkiem dr hab.  
Piotra Piszczka, prof. UMK i dr hab. Aleksandry Radke.

#### 1. Charakterystyka pracy doktorskiej

Praca doktorska Pani mgr Michaliny Ehlert zawiera wyniki badań związane z modyfikacją właściwości mechanicznych i biointegacyjnych stopu Ti6Al4V, celem wytworzenia warstwy sprzyjającej osteointegracji implantu kostnego. Praca składa się z dwóch części:

Część I skupia się na modyfikacja powierzchni próbek stopu Ti6Al4V prowadząca do wytworzenia warstw tlenków tytanu o zróżnicowanej morfologii, strukturze oraz właściwościach mechanicznych i biologicznych.

Część II opisuje wykorzystanie tlenkowych nanowarstw, o najlepszych właściwościach fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych (wyprodukowanych w Etapie I),

jako warstwy pośredniej łączącej powłokę hydroksyapatytu, wytwarzaną w procesie katodowej elektrodepozycji, z podłożem ze stopu Ti6Al4V.

Prac rozpoczyna się bardzo ciekawie od słów Marii Skłodowskiej-Curie: „Niczego w życiu nie należy się bać, należy to tylko zrozumieć”. Główny cel pracy został określony jako opracowanie technologii modyfikacji powierzchni implantów wytwarzanych ze stopu Ti6Al4V (w tym implantów wytwarzanych w technologii 3D (spiekanie laserowe proszków tytanowych przeznaczonych dla wyrobów medycznych) powłokami hydroksyapatytu, które przy zachowaniu dobrych właściwości fizykochemicznych i mechanicznych będą przyspieszały regenerację tkanki kostnej, działały stymulująco względem komórek zaangażowanych w osteopromocję i osteointegrację oraz tworzyły biogodną matrycę dla nawarstwiania regenerującej się tkanki.

Motywacja do tych badań wynika ze słabych własności osteoinduktywnych materiałów tytanowych, umożliwiające połączenia materiał z tkanką kostną. W związku z tym Pani Michalina Ehlert skupiła się na modyfikacjach powierzchni implantów ze stopu Ti6Al4V, które w formie proszków były spiekane laserowe proszków tytanowych przeznaczonych dla wytworzenia prototypu implantów stomatologicznych oraz ortopedycznych posiadających aktywną warstwę sprzyjającą regeneracji kości.

W badaniach badań przedstawiono charakterystykę fizykochemiczną, mechaniczną oraz biologiczną 13 zróżnicowanych nanowarstw TiO<sub>2</sub>/titanianu. Scharakteryzowano 24 układy z powłoką hydroksyapatytową, pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i mechanicznych, a następnie oceniono aktywność biologiczną wybranych, trzech układów. Innowacyjnym rozwiązaniem jest opracowanie metody dwustopniowej modyfikacji (TNT5/HA) implantu ze stopu Ti6Al4V do zastosowania w produkcji implantów stomatologicznych oraz ortopedycznych.

Rozprawa doktorska obejmuje 88 stron i składa się z 8 rozdziałów: wprowadzenie z przeglądem literatury, cele pracy, streszczenie artykułów naukowych metody eksperymentalne, wyniki badań wraz z dyskusją i wnioski oraz podsumowanie i wdrożenie. Na końcu znajdują się bibliografia zawierająca 192 pozycji i dorobek naukowy kandydatki na doktora oraz załączniki: artykuły i oświadczenia współautorskie. Na prace składają się następujące publikacje:

- **P1.** Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Bartmański, M.; Radtke, A.; *Titania, Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies*. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, 20, 5642, doi: 10.3390/ijms20225642. IF2019= 4.556
- **P2.** Ehlert, M.; Radtke, A.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Bartmański, M.; Piszczek, P. *In Vitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells*. **Materials** 2020, 13, E1574, doi:10.3390/ma13071574. IF 2020= 3.62338

- **P3.** Ehlert, M.; Radtke, A.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T.; Piszczek, P. *Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties*. **Materials** 2021, 14, 806, doi:10.3390/ma14040806. IF 2021= 3.748
- **P4.** Ehlert\*, M.; Radtke, A.; Bartmański, M.; Piszczek\*, P. Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V–Based Biomaterials. **Materials** 2022, 15, 6925, doi:10.3390/ma15196925. IF 2022= 3.748
- **P5.** Ehlert\*, M.; Radtke\*, A.; Forbot, N.; Jędrzejewski, T.; Roszek, K.; Golińska, P.; Trykowski, G.; Piszczek, P. TiO<sub>2</sub>/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential. **Journal of Functional Biomaterials** 2022, 13, 271, doi.org/10.3390/jfb13040271. IF 2022= 4.901

Ponadto Doktorantka umieściła streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów i oznaczeń. Praca posiada 14 rysunków nie wliczając tych zawartych w pięciu publikacjach. Rozdział pierwszy zawiera wprowadzenie w tematykę badawczą, w tym informacje na temat implantów tytanowych i ich modyfikacji. Części teoretyczną rozpoczęła od definicji biomateriału z zarysem historycznym i podziałem na materiały pochodzenia naturalnego i syntetycznego. Opisane zostały też oddziaływania tkanka kostna – biomateriał włączając procesy osteointegracji i własności mechaniczne tkanki kostnej. W dalszej części opisane zostały biomateriały metaliczne bazując na tytanie i jego stopach oraz modyfikacjach powierzchni implantów tytanowych. Powierzchnia biomateriału i jej własności są niezwykle ważne w procesie adsorpcji białek i tworzeniu macierzy pozakomórkowej. Dokładnie opisała proces oddziaływań na granicy komórka-materiał, podkreślając w ten sposób znacznie na proces odbudowy kości obejmujący osteoindukcję, osteokondukcję i osseointegrację. W opisie technologii modyfikacji podłoży tytanowych skupiła się Autorka na elektrochemicznym utlenianiu, (proces anodowania), chemicznym utlenianiu nadtlakiem wodoru i alkaicznym roztworem oraz na wywarzaniu powłok hydroksyapatytowych.

W mojej ocenie zakres przeglądu literatury został dobrany trafnie i rzetelnie przedstawiony, w związku z czym Doktorantka jasno sformułowała cele pracy i zaplanowała badania eksperymentalne. Szeroki i bardzo dobrze zestawiony opis literatury pozwolił Doktorantce w dalszej części pracy przeprowadzić przejrzystą dyskusję otrzymanych wyników. W części doświadczalnej w rozdziale 4 zostały opisane publikacje składające się na część pracy doktorskiej, które zostały już wcześniej wymienione.

## 2. Ocena pracy

Badania zostały przeprowadzone w sposób systematyczny i staranny. Zaletą pracy jest podjęcie bardzo ciekawej tematyki pracy, której celem było opracowanie modyfikacji powierzchni implantu. Mimo że praca składa się z cyklu 5 publikowanych artykułów,

które zostały poddane procesowi recenzji chciałabym zwrócić uwagę na kilka punktów do dyskusji.

**Publikacja P1.** Titania, Nanofiber Scaffolds with Enhanced Biointegration Activity—Preliminary In Vitro Studies.

*International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20, 5642

1. W artykule rysunki zawierające mikrografie SEM nie są oznaczone a) b) co utrudnia odnoszenie się do zdjęć w tekście. To samo dotyczy powtórnego rys. 6 na stronie 40.
2. Brak podania parametrów obrazowania SEM w metodach.
3. W metodzie opisu pomiaru kąta zwilżania nie ma podanych wartości swobodnej energii powierzchniowej użytych płynów.
4. Jaki rodzaj igły był użyty do pomiarów chropowatości przy użyciu AFM?
5. Jaki został policzony parametr chropowatości powierzchni  $S_a$  i jak koreluje się on z wynikami pokazującymi zmiany w kątach zwilżania?
6. Jeśli chropowatość wpłynęła na kąty zwilżania wyniki obliczeń napięcia powierzchniowego podłoża?
7. Jaka była temperatura otoczenia i wilgotność podczas pomiarów kąta zwilżania?
8. Proszę o dołączenie wzorów z jakich Pani korzystała do obliczeni napięcia powierzchniowego metodą Owens-Wendt.

**Publikacja P2:** InVitro Studies on Nanoporous, Nanotubular and Nanosponge-Like Titania Coatings, with the Use of Adipose-Derived Stem Cells

*Materials* 2020, 13, E1574,

1. Czy w badaniach rozważane było przedłużenie testów proliferacji komórek powyżej 72 h?
2. Czy rozważane były testy adhezji komórek do podłoża w zależności od modyfikacji?
3. W metodzie Owens-Wendt są potrzebne co najmniej 3 punkty pomiaru, czyli powinny być stosowane 3 płyny o różnym napięciu powierzchniowym. W tej publikacji są wspomniane jedynie 2, co powoduje duży błąd obliczeniowy.
4. Brak dyskusji odniesienie się wyników swobodnej energii powierzchniowej do innych pomiarów czy też danych literaturowych.
5. Dlaczego w Tabeli 1 – SD dla wyników obliczeń Surface Free Energy jest taki sam 0.3 czy na pewno wpisane odchylenie jest poprawne?

6. Jak chropowatość próbek wpływa na testy mechaniczne powłoki?
7. Dlaczego proliferacja komórek po 72 h spada na próbkach Ti (Fig 5), czy trend ten się utrzymuje przy dłuższych hodowlach?

**Publikacja P3:** Assessment of Titanate Nanolayers in Terms of Their Physicochemical and Biological Properties

*Materials* 2021, 14, 806

1. Przy jakich ustawieniach zostały wykonane badania EDS i obrazowanie SEM?
2. Czy przeprowadzone zostały badania przylegania/adhezji powłok na Ti6Al14V?
3. W podsumowanie Autorka wspomina o nie najlepszych własnościach mechanicznych warstw, nasuwa się pytanie w jaki sposób mogą być one poprawione?

**Publikacja P4:** Evaluation of the Cathodic Electrodeposition Effectiveness of the Hydroxyapatite Layer Used in Surface Modification of Ti6Al4V–Based Biomaterials.

*Materials* 2022, 15, 6925

1. W związku ze zmianą morfologii warstw, chropowatość powierzchni też się zmieniała, czy jest jakaś korelacja między zmianą parametrów wytwarzania warstwy a wartościami Ra przedstawionymi w Tabeli 3 w publikacji?

**Publikacja P5:** TiO<sub>2</sub>/HA and Titanate/HA Double Layer Coatings on Ti6Al4V Surface and Their Influence on In Vitro Cell Growth and Osteogenic Potential.

*Journal of Functional Biomaterials* 2022, 13, 271,

1. Pytanie odnośnie własności antibakteryjnych. Dlaczego otrzymane powierzchnie nie są antibakteryjne? Z czego to wynika i jak te własności mogą być osiągnięte?
2. Czy własności antibakteryjne są konieczne dla tych powłok?

Dodatkowo ogólne pytania całościowe do pracy:

1. Zastanawiające jest czy część wyników została opatentowana, jeśli nie czy planowane jest ochrona patentowa, co w przypadku wdrożenia może być bardzo przydatne rozwiązanie dla firmy?

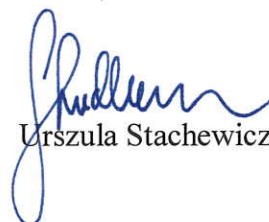
2. Czy Doktoranta może zaproponować najlepsze rozwiązanie na podstawie przeprowadzonych badań dla kontrolowanego stosunku Ca/P na powłokach HA?

Uwagi o charakterze dyskusyjnym i uwagi redakcyjne zawarte w tej recenzji nie wpływają na pozytywną ocenę pracy. Są one wskazówkami przydanymi w dalszym rozwoju naukowo-badawczym Doktorantki.

3. Ocena końcowa pracy

Po zapoznaniu się z pracą doktorską i przeanalizowaniu wyników stwierdzam, że cele badawcze zostały bardzo dobrze opisane i rozważone. Praca ta jest świetnym przykładem interdyscyplinarnych badań obejmujących metody wywarzania powłok, ich charakteryzację połączoną z odpowiedziami biologicznymi. Imponujące jest to że jest to doktorat wdrożeniowy z 5 publikacjami. Z tego względu praca powinna zostać wyróżniona, ponieważ obejmuje niezwykle ważne tematy z możliwością zastosowania otrzymanych wyników.

Praca Pani mgr Michaliny Ehlert, pt. „Wytwarzanie i charakterystyka układu: implant metaliczny/tlenkowa warstwa pośrednia/hydroksyapatyt oraz badanie jego interakcji z ludzkimi, mezenchymalnymi komórkami macierzystymi” zawiera wartościowe wyniki badań i ich dyskusję. Według mojej opinii praca ta spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim, określone ustawą o stopniach i tytułach naukowych. Wnioskuje do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej i o dopuszczenie Pani mgr Michaliny Ehlert do publicznej obrony.



Urszula Stachewicz