

dr hab. n. med. Rafał Koszowski

05. 01. 2017 r.

Akademickie Centrum Stomatologii

i Medycyny Specjalistycznej

pl. Akademicki 17

41-902 Bytom

OCENA

rozprawy doktorskiej **lek. dent. Rafała Pokrowieckiego**

z Zakładu Chirurgii Stomatologicznej Instytutu Stomatologii Collegium
Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

pt. **„Ocena wykorzystania nanocząstek srebra w celu modyfikacji warstwy
wierzchniej biomateriałów tytanowych”**

Promotor : dr hab. n. med. Małgorzata Zaleska, prof. UJ

Promotor pomocniczy: dr inż. Barbara Szaraniec

Implantologia jest obecnie jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się, interdyscyplinarnych dziedzin stomatologii. Zainteresowanie tą metodą leczenia stawia przed nią szereg wyzwań, dotyczących nie tylko estetyki, trwałości i funkcjonalnej jakości uzupełnień implantoprotetycznych, lecz także ograniczenia uciążliwości wykonywanych zabiegów oraz ryzyka powikłań z nimi związanych. Jednym z trudniejszych problemów, przed którymi stoi współczesna implantologia stomatologiczna są zakażenia okołowszczepowe, w zaawansowanym stadium prowadzące do resorpcji kości i utraty osteointegracji implantów. Dane epidemiologiczne wskazują, iż do zakażenia okołowszczepowych tkanek miękkich (*peri-implant mucositis*) dochodzi aż u około 60 % pacjentów, przy czym w 20 % przypadków następuje destrukcja tkanki kostnej (*periimplantitis*). Walka z tym powikłaniem jest bardzo trudna, zwłaszcza wobec obserwowanej obecnie, wzrastającej lekooporności drobnoustrojów. Dlatego wciąż podejmowane są próby opracowania optymalnego makro- i mikroskopowego kształtu implantów i łączników protetycznych, sprzyjającego osteointegracji i prawidłowemu ukształtowaniu tkanek miękkich, ale także utrudniającego powstawanie biofilmu bakteryjnego

na ich powierzchni. Z uwagi na powyższe podjęcie przez lek. dent. Rafała Pokrowieckiego tematyki wykorzystania nanocząstek srebra w celu modyfikacji warstwy wierzchniej biomateriałów tytanowych uważam za niezwykle trafne i bardzo ważne z punktu widzenia praktyki klinicznej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę wydruku komputerowego i liczy łącznie 85 stron. W pracy 23 strony przypadają na Wstęp i Cel Badań, Materiał i Metodę opisano na 8 stronach, Wyniki przedstawiono na 17 stronach, natomiast Omówienie wyników i Dyskusja liczą 15 stron. Ponadto praca zawiera 5 wniosków, 198 pozycji piśmiennictwa zamieszczonych w porządku alfabetycznym, objaśnienie pojęć i skrótów stosowanych w pracy oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Część wstępną Autor podzielił na dwa podrozdziały. W pierwszym omawia współczesny stan wiedzy na temat zakażeń okołowszczepowych w implantologii stomatologicznej, a w drugim uzasadnia wybór podjętej problematyki badawczej. Szczegółowo przedstawiona została etiopatogeneza zakażeń okołowszczepowych z uwzględnieniem czynników sprzyjających temu powikłaniu, morfologii tkanek okołowszczepowych, formowaniu biofilmu bakteryjnego na powierzchniach implantów oraz diagnostyki i dostępnych metod leczenia. Należy podkreślić, że informacje zawarte we Wstępie zostały przedstawione w sposób bardzo zorganizowany i czytelny. Rozdział ten jasno wskazuje, iż lek. dent. Rafał Pokrowiecki jest odpowiednio przygotowany teoretycznie do prowadzenia badań w zakresie wyznaczonym tematyką rozprawy doktorskiej.

Celem głównym pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy uzasadnione jest wytwarzanie biozgodnych powierzchni tytanowych z dodatkiem nanosrebra o działaniu antybakteryjnym. Przyjęto tezę wstępną, iż naniesienie nanocząstek srebra na powierzchnię tytanu zapewni działanie bakteriobójcze w stosunku do *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*. Drogą potwierdzenia lub odrzucenia hipotezy badawczej było znalezienie odpowiedzi na 5 następujących hipotez szczegółowych:

1. właściwości bakteriobójcze nie zmieniają się w zależności od czasu nanoszenia nanosrebra na powierzchnię tytanu,

2. czas inkorporacji nanocząstek srebra w warstwę wierzchnią tytanu nie wpływa na jej chropowatość (Ra),
3. czas inkorporacji nanocząstek srebra w warstwę wierzchnią tytanu nie wpływa na jej zwilżalność (Ca),
4. obecność nanocząstek srebra nie wpływa na bioaktywność powierzchni tytanu,
5. obecność nanocząstek srebra nie wpływa na cytotoksyczność materiału w stosunku do pierwotnych osteoblastów linii NHOst.

Badania przeprowadzono w Katedrze Biomateriałów Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. Pierwszą grupę kontrolną (K1) stanowiło 175 komercyjnych gładkich krążków wykonanych z czystego tytanu typu Grade-2 (Torresin Titanio – Metali S.R.L., Włochy) o średnicy 10 mm i grubości 1 mm, których powierzchnię, po odpowiednim przygotowaniu, poddano modyfikacji metodą podwójnego trawienia kwasem fluorowodorowym oraz kwasem azotowym. Drugą grupę kontrolną (K2) stanowiło 175 krążków tytanowych poddanych dodatkowemu trawieniu w 10 M roztworze NaOH przy wykorzystaniu metody hydrotermalnej. Na część płytek grupy K2 naniesiono nanocząstki srebra wykorzystując procedurę Tollens'a, zgodnie z którą w odpowiednio przygotowanym roztworze krążki tytanowe przetrzymywano kolejno przez 30 sekund, 2 minuty, 5 oraz 10 minut. W zależności od czasu nanoszenia srebra poszczególne płytki oznaczono symbolami: Ag0,5; Ag2; Ag5; Ag10. Tak przygotowane płytki tytanowe oraz płytki z obu grup kontrolnych poddano analizie właściwości fizykochemicznych, bakteriobójczych oraz dokonano oceny ich biogodności.

Aby poznać wpływ nanoczątek srebra na właściwości modyfikowanej powierzchni tytanu przeprowadzono pomiary chropowatości (Ra), zwilżalności (Ca), dokonano oceny mikrotopografii powierzchni posługując się skaningową mikroskopią elektronową oraz przeprowadzono identyfikację pierwiastków obecnych w warstwie wierzchniej materiału stosując mikroanalizę rentgenowską. W tym celu wykorzystano elektronowy mikroskop skaningowy (SEM, Nova NanoSEM, FEI, Stany Zjednoczone) współpracujący z analizatorem EDS (EDAX, Holandia). Celem oceny kinetyki uwalniania jonów srebra z powierzchni płytek tytanowych posłużono się badaniem atomowej spektrometrii emisyjnej z wzbudzeniem plazmowym.

Badania mikrobiologiczne przeprowadzono w Zakładzie Antybiotyków i Mikrobiologii Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, do których użyto po trzy szczepy kliniczne bakterii izolowanych z jamy ustnej: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* i *Porphyromonas gingivalis* oraz szczepy *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*.

Oceny biogodności dokonano określając wpływ rodzaju modyfikacji powierzchni na formowanie kryształów apatytu. Posługiwano się w tym celu skaningową mikroskopią elektronową oraz mikroanalizą rentgenowską. Przeprowadzono również badania biologiczne z wykorzystaniem hodowli komórek linii ciągłych NHOb (Normal Human Osteoblasts). Wykonano je w Zakładzie Cytobiologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej we współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Telemedycyny Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Zastosowano program STATISTICA 12 PL. Dla porównania dwóch grup wykorzystano test t-studenta. Dla porównania kilku grup posłużono się analizą wariancji (ANOVA), a w przypadku braku spełnienia założeń nieparametrycznym testem Kruskala-Walisa. Do porównań szczegółowych użyto testu *post-hoc* Tukeya. Otrzymane wyniki zilustrowano wykresami przedstawiającymi wartość średnią oraz jej 95% przedział ufności. Jako istotne przyjęto wyniki, dla których poziom prawdopodobieństwa p jest mniejszy od przyjętego poziomu istotności $\alpha = 0,05$.

Pragnę podkreślić, iż zaplanowanie wielokierunkowej metodyki badań i zakres ich wykonania, wymagający współpracy z licznymi ośrodkami naukowo-badawczymi, wymownie świadczą o wysokim poziomie naukowym Doktoranta i umiejętnym posługiwaniu się narzędziami badawczymi.

Wyniki zostały przedstawione w postaci bardzo starannego opracowania z wykorzystaniem licznych rycin, tabel i wykresów wraz z ich omówieniem. Zwraca uwagę rozbudowana analiza statystyczna wyników, świadcząca o wysokim poziomie naukowym Autora. Lek. dent. Rafał Pokrowiecki wykazał, iż modyfikacja powierzchni tytanowych nanocząstkami srebra wpływa na takie właściwości fizykochemiczne powierzchni materiału jak chropowatość i zwilżalność, które mają znaczenie w procesie adaptacji tkanek okołowszczepowych i formowania się biofilmu bakteryjnego. Autor udowodnił,

że powierzchnie tytanowe, na które naniesiono nanocząstki srebra, wykazują właściwości bakteriobójcze w stosunku do bakterii wchodzących w skład biofilmu obecnego na implantach stomatologicznych. Zaobserwował, iż właściwości bakteriobójcze powierzchni tytanowych modyfikowanych nanosrebrem związane są z uwalnianiem jonów do środowiska i z tego powodu ich potencjał bakteriobójczy obniża się wraz z czasem przebywania implantu w organizmie. Badania przeprowadzone przez Doktoranta udowodniły, że obecność nanocząstek srebra może obniżać właściwości bioaktywne powierzchni tytanowych, jak również sprzyjać cytotoksyczności w stosunku do osteoblastów.

W interesującej i sprawnie poprowadzonej dyskusji lek. dent. Rafał Pokrowiecki przedstawił wnioski wypływające z badań własnych i porównał je z wynikami innych autorów. Poddał również analizie stosowane przez nich metody badawcze i odniósł je do metodyki pracy własnej. Szerokie omówienie poruszanych zagadnień i umiejętna konfrontacja obserwacji własnych z danymi z piśmiennictwa pozwalają bardzo dobrze ocenić dojrzałość naukową Doktoranta i jego rozległą wiedzę na podjęty temat.

Rozprawę kończą wnioski, łącznie w liczbie pięciu, które są logicznym podsumowaniem badań własnych i odpowiadają na postawione cele. Najistotniejsza konkluzja, z punktu widzenia praktyki klinicznej, zawarta jest we wniosku 5. Autor stwierdza w nim, iż materiały modyfikowane nanocząstkami srebra mogą znaleźć zastosowanie w produkcji implantów stomatologicznych, o ile zostanie rozwiązany problem stabilizacji uwalniania jonów srebra z powierzchni tytanu oraz zostanie określona bezpieczna dawka nanocząstek i jonów srebra, nie powodująca toksyczności w stosunku do organizmu ludzkiego.

Obszerne piśmiennictwo obejmujące 198 pozycji, niemal w całości anglojęzycznych, jest aktualne, właściwie dobrane i prawidłowo cytowane. Stanowi ono odzwierciedlenie współczesnej wiedzy dotyczącej problemów poruszanych w rozprawie doktorskiej.

Drobne uwagi, które nasuwają się w trakcie czytania dysertacji mają charakter wyłącznie edytorski, np. użycie terminów kolokwialnych - jak często stosowane w praktyce klinicznej określenie „*zdjęcie punktowe*” (str. 20) zamiast „*zdjęcie zębowe*”, „*na rysunku*” (str. 38) zamiast „*na rycinie*”, czy też kilka błędów literowych. Te mało istotne błędy mogą z łatwością zostać skorygowane

podczas przygotowania pracy do publikacji i zupełnie nie wpływają na merytoryczną wartość rozprawy.

Podsumowując, uważam rozprawę lek. dent. Rafała Pokrowieckiego za interesującą, nowatorskie i wartościowe opracowanie na bardzo dobrym poziomie naukowym. Posiada ono duże znaczenie poznawcze, a przedstawione wyniki mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie kliniczne. Interpretacja wyników jest logiczna i sumiennie przeprowadzona. Należy także podkreślić staranną szatę graficzną opracowania oraz bogaty materiał ilustracyjny.

Uważam, że przedstawiona rozprawa pod tytułem „*Ocena wykorzystania nanocząstek srebra w celu modyfikacji warstwy wierzchniej biomateriałów tytanowych*”, spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim w świetle Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i na tej podstawie składam do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie lek. dent. Rafała Pokrowieckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie oceniając bardzo wysoko przedstawioną dysertację i biorąc pod uwagę:

- nowatorski charakter rozprawy,
- metodologię badań,
- istotność wyników dla praktyki klinicznej,
- opracowanie na wysokim poziomie naukowym,

pragnę przedstawić Wysokiej Radzie wniosek o jej wyróżnienie.



Dr hab. n. med. Rafał Koszowski