

Prof. dr hab. Izabella Krucińska  
Instytut Materiałoznawstwa Tekstyliów  
i Kompozytów Polimerowych,  
Wydział Technologii Materiałowych  
i Wzornictwa Tekstyliów

Łódź 27.03.21 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Julii Higuchi pt. „Biodegradable Barrier Membranes for Tissue Separation Fabricated by Means of Electrospinning and Ultrasonic Coating with Hydroxyapatite Nanoparticles”**

**Podstawa wykonania recenzji**

Recenzję przygotowano na podstawie zlecenia wystawionego w dniu 13.01.21 r. przez Prodziekana Wydziału Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej profesor dr. hab. Annę Boczkowską.

**Ocena rozprawy doktorskiej**

Recenzowana rozprawa doktorska obejmuje dziewięć rozdziałów bez załączników i jest przedstawiona na 116 stronach. W rozdziale pierwszym Doktorantka określiła obszar swoich badań związanych z biomateriałami dla stomatologii przedstawiając krótki przewodnik po kolejnych rozdziałach rozprawy doktorskiej. Po wprowadzeniu czytelnika w obszar swoich zainteresowań naukowych Doktorantka przystąpiła do dokonania dogłębnej wielowymiarowej analizy literaturowej, obejmującej wiedzę zarówno z dziedziny nauk biologicznych jak i nauk technicznych w szczególności z zakresu inżynierii biomateriałów i ich biokompatybilności. Doktorantka skupiła się na omówieniu zagadnień z zakresu biomateriałów stosowanych do regeneracji tkanki kostnej w kontekście leczenia chorób przyzębia. Omówiła szczegółowo przyczyny występowania choroby oraz metody jej leczenia, wskazując na przydatność stosowania membran barierowych, których rolą jest separacja tkanek kości i tkanek miękkich dziąseł w procesie regeneracji kości. Doktorantka omówiła właściwości dostępnych na rynku membran nieresorbowalnych i resorbowalnych. W produkcji membran resorbowalnych głównie stosuje się kolagen oraz polimery syntetyczne z grupy polilaktydów, poli(laktyd-ko-glikolid) i poli(kwas glikolowy). Działanie tych

polimerów jest wspierane aktywnością nanododatków ceramicznych w postaci hydroksyapatytu,  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -trójfosforanu wapnia) czy bioszklą. Nanododatki ceramiacne wspomagają proces odżywiania kości w procesie regeneracji dostarczając jonów wapnia czy fosforu. W podrozdziale 2.11 doktorantka sformułowała tezę pracy zakładając hipotetycznie, iż połączenie technologii mikrofalowej syntezy nanododatków, elektroprzędzenia włókien membrany i ultrasonicznego pokrywania powierzchni włókien nanododatkami przyczyni się do rozwoju membran separacyjnych o podwyższonej zwilżalności, kontrolowanej biodegradowalności i stymulujących rozrost tkanki kostnej zębodołu. Doktorantka twierdzi, iż na rynku obecnie nie można znaleźć membran o wymienionych cechach, co wydaje mi się twierdzeniem zbyt radykalnym. Wszystkie wymienione technologie w tezie pracy są technologiami znanymi i w literaturze przedmiotu można znaleźć bardzo dużo publikacji dotyczącymi różnych wyrobów produkowanych przy użyciu wymienionych technik.

Mimo tego z zainteresowaniem zapoznałam się z częścią eksperymentalną rozprawy doktorskiej. Jako materiał badań do wytworzenia włókien tworzących membranę doktorantka przyjęła mieszaninę polimerów poli(D,L-laktydu) (PDLLA) i poli(L-laktydu-ko-glikolidu) (PLGA). Oba polimery, co wynika z badań, są biodegradowalne, włóknotwórcze, posiadają dobre właściwości wytrzymałościowe i są biokompatybilne. Działanie wspomagające rozrost tkanki kostnej doktorantka postanowiła realizować z użyciem nanohydroksyapatytu, syntezowanego metoda mikrofalową. Synteza nHA tą metodą została opracowana w Instytucie Wysokich Ciśnień Polskiej Akademii Nauk przez innych autorów. Doktorantka wskazuje na możliwość uzyskania zróżnicowanych wymiarów ziaren nanohydroksyapatytu co pociąga za sobą między innymi zróżnicowaną podatność do rozpuszczania tej substancji w medium biologicznym. Doktorantka stanęła więc przed wyborem materiału badawczego i postanowiła przeprowadzić badania dla nanohydroksyapatytu typu GoHAP 3 o wielkości ziaren  $19 \pm 2$  nm i GoHAP 6 wielkości ziaren  $42 \pm 4$  nm. Przyjęty zestaw ziaren miał przedłużyć okres uwalniania jonów podczas kontaktu z płynami biologicznymi i w ten sposób wydłużyć czas odżywiania regenerowanej tkanki. W tym miejscu doktorantka powróciła do omawiania doniesień literaturowych odnoszących się do specyficznych warunków technologicznych prowadzenia procesu mikrofalowej syntezy nanohydroksyapatytu, produkcji włókien membrany z zastosowaniem metody elektroprzędzenia i procesu wykańczalniczego metodą sonicznego pokrywania włókien nanododatkami. W ten sposób doktorantka podała charakterystykę metodyki prowadzenia badań technologicznych.

Doktorantka zrealizowała proces elektroprzędzenia z zastosowaniem roztworów polimerów w mieszaninie rozpuszczalników chloroformu i DMF- u zmieszanych w proporcji

85%/15%. Wydaje się, iż wybór rodzaju rozpuszczalników nie był trafny ze względu na dużą toksyczność N,N- dimetyloformamidu. Będę wdzięczna za podanie przesłanek jakimi się kierowała doktorantka przy wyborze rodzaju użytych rozpuszczalników. Brak jest również zgodności w zakresie wyboru rodzaju polimerów do formowania włókien. Na stronie 45 doktorantka stwierdziła, iż do badań użyto mieszaniny polimerów poli(D,L-laktydu) (PDLLA) i poli(L-laktydu-ko-glikolidu) (PLGA) a na stronie 55 znajdujemy informację, iż również stosowała same polimery w postaci PDLLA i PLGA. Doktorantka nie podała charakterystyki zastosowanych polimerów w rozdziale dotyczącym materiałów. W określeniu warunków prowadzenia procesu elektroprzędzenia nie podano również warunków atmosferycznych powietrza w jakich będzie prowadzony proces elektroprzędzenia. W dalszej części pracy scharakteryzowano metodykę badań umożliwiającą dogłębną analizę właściwości wytworzonych wariantów membran. Opisana metodyka świadczy o bogatym warsztacie naukowym jakim posługuje się doktorantka przy opisie właściwości nowego materiału co jest wymagane od doktora nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria materiałowa. Wyniki przeprowadzonych wnikliwych badań wytworzonych membran zarówno właściwości fizycznych jak i biologicznych zostały omówione przez doktorantkę w rozdziale 4. Mam w tym miejscu uwagi krytyczne co do podstaw przyjętych warunków elektroprzędzenia. Na stronie 73 doktorantka pisze, iż przyjęła: wartość stężenia roztworu do elektroprzędzenia wynoszącą 15 %, odległość między igłą a kolektorem równą 20 cm, przyłożone napięcie wynoszące 15 kV, wilgotność powietrza w zakresie 40-50%, średnicę igły równą 08, mm i wydatek polimeru wynoszący 20 $\mu$ l/ min, powołując się na kolejne rysunki. Podpisy pod rysunkami nie wskazują dla jakiego rodzaju polimeru otrzymano obrazy nanowłókien. Brakuje również charakterystyki stosowanych roztworów np. ich lepkości czy elektroprzewodności. Brak wymienionych danych uniemożliwia poprawną interpretację wyników badań. Dlatego też proszę, aby doktorantka uzupełniła jednoznacznie dane dotyczące materiału badawczego użytego w procesie elektroprzędzenia. Tym bardziej, iż rysunek 29 wskazuje, iż doktorantka wytwarzała membrany z użyciem trzech rodzajów polimeru. Błąd ten został powielony podczas omawiania wyników pokrywania sonicznego powierzchni włókien nanohydroksyapatytem. Podpisy pod rysunkami, które ilustrują dobór warunków depozycji również nie informują jakiego typu włókna były pokrywane. Informacja taka pojawia się dopiero pod rysunkiem 35 gdzie przedstawiono wyniki dla mieszaniny PDLLA i PLGA. Na rysunkach 37 i 38 przedstawiono natomiast wyniki dla trzech typów włókien PDLLA i PLGA, PDLLA i PLGA. Proszę, aby dyplomantka wyjaśniła przyczynę selektywnego przedstawiania wyników pomiarów w zależności od zastosowanej metody

badan i jednoznacznie określiła materiał badawczy. Interesującym natomiast rozwiązaniem było pokrywanie warstwowe nanohydroksyapatytem o zróżnicowanej wielkości ziaren realizowane celem przedłużenia uwalniania jonów wapnia i fosforu z powierzchni włókien w procesie resorpcji, co wykazano z użyciem techniki ICP-OES.

Badania biologiczne wskazują, iż aktywność metaboliczna komórek MG-63 hodowanych na podłożu wykonanym z włókien PDLLA/PLGA pokrytych nanohydroksyapatytem w ilości nieokreślonej wzrasta w porównaniu do membrany bez nanododatku dopiero po 24 godzinach. W przypadku komórek fibroblastów ta aktywność zaczyna być obserwowana wcześniej, lecz nie jest ona w tak dużym stopniu zróżnicowana jak w przypadku komórek MG-63. Wskazuje to na poprawność przyjętego założenia, iż obecność uwalnianych jonów wapnia z hydroksyapatytu sprzyjać będzie namnażaniu się komórek kostnych. W opisie po raz kolejny materiał badań nie jest jednoznacznie określony, ponieważ nie wiadomo czy do badań pobrano próbki o warstwowym rozkładzie ziaren hydroksyapatytu.

Na docenienie zasługuje sposób prezentacji pracy, która jest przedstawiona w formie monografii napisanej w języku angielskim. Edytorsko praca przygotowana została bardzo starannie.

### **Zagadnienia do dyskusji podczas rozprawy**

Podczas rozprawy proszę, aby Doktorant odniósł się do następujących zagadnień.

1. Proszę wyjaśnić przyczynę, dla której nie podano pełnej charakterystyki polimerów i roztworów polimerów stosowanych w procesie elektroprzędzenia oraz warunków doboru parametrów technologicznych dla wszystkich stosowanych roztworów.
2. Jakie przyjęto kryteria do eliminacji z dalszych badań biologicznych membran wykonanych z PDLLA i PLGA pokrytych hydroksyapatytem.
3. Dlaczego we wnioskach nie uzasadniono wyboru końcowej formy membrany i nie zdefiniowano dokładnie jej cech.

### **Podsumowanie**

Praca ma charakter nowatorski i wpisuje się w zakres innowacyjnych badań prowadzonych w obszarze inżynierii materiałowej. Badania Doktorantki dotyczą rozwoju nowych materiałów stosowanych do separacji tkanki miękkiej od tkanki kostnej w procesie leczenia chorób przyzębia. Doktorantka oprócz rozwoju nowych materiałów opracowała nową oryginalną metodę dwuwarstwowego pokrywania

włókien nanohidroksyapatytem o zróżnicowanym rozkładzie wielkości ziaren. Głównym wkładem Doktorantki w rozwój dziedziny inżynieria materiałowa jest:

- optymalny dobór składu mieszanki polimerowej gwarantujący wytworzenie nanowłóknistych membran o wytrzymałości umożliwiającej nanoszenie warstw nanohidroksyapatytu metoda soniczną wykorzystując zjawisko kawitacji,
- modyfikacja warstwy powierzchniowej nanowłókien membrany separacyjnej z zastosowaniem wielowarstwowego pokrycia nanohidroksyapatytem, zmieniająca tym samy charakter powierzchni z hydrofobowego na hydrofilowy,
- opracowanie oryginalnej konstrukcji membrany separacyjnej o zaprogramowanym czasie resorpcji wspomagającej proces regeneracji kości przyzębia,
- przeprowadzenie wstępnej weryfikacji właściwości biologicznych opracowanych membran, wyniki, której pozwalają wnioskować o potencjalnej przydatności tych wyrobów jako materiałów wszczepiennych.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzenia stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Julii Higuchi do publicznej obrony. Przedstawiona praca w pełni spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”.

