

dr hab. inż. Barbara Szaraniec, prof. AGH

Kraków, 25 sierpnia 2021 r.

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA

IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

Katedra Biomateriałów i Kompozytów

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr. inż. Dawida Łysika**

pt.: "Procesy degradacji wybranych biomateriałów polimerowych w środowisku sztucznej śliny"

na zlecenie Senatu Politechniki Białostockiej Uchwała nr 99/XI/XVI/2021
z dnia 24.06.2021 r. (pismo WM-IIB.4130.1.21 z dnia 1.07.2021 r.)

Przedstawiona praca doktorska Pana mgr. inż. Dawida Łysika dotyczy tematyki biodegradacji wybranych polimerów degradowalnych stosowanych na wyroby medyczne w obrębie jamy ustnej. Do badań prowadzonych w warunkach sztucznej śliny wybrano polilaktyd i polikaprolakton, będące jednymi z najpopularniejszych polimerów biomedycznych. Ważnym aspektem pracy był dobór warunków inkubacji i opracowanie substytutu śliny, który w najbardziej wierny sposób odwzorowywałby skład i zachowanie naturalnej śliny. Opracowana sztuczna ślina mogłaby stanowić optymalne środowisko do badań *in vitro* biomateriałów dedykowanych m.in. dla stomatologii, jak również znaleźć zastosowanie w leczeniu lub łagodzeniu objawów kserostomii.

Eksperymenty prowadzone w warunkach *in vitro* w sztucznych płynach fizjologicznych od wielu lat stanowią niezbędny i cenny etap badań biomateriałów. Dzięki inkubacji w płynach o składzie chemicznym odpowiadającym lub zbliżonym do tego, jaki istnieje w organizmie w miejscu implantacji, możliwe jest zbadanie wzajemnego wpływu materiał-środowisko wodne oraz określenie zarówno zmian zachodzących w materiale,

jak i zmian wywołanych obecnością materiału zachodzących w płynie immersyjnym. W literaturze można znaleźć liczne propozycje sztucznych płynów fizjologicznych, różniących się składem chemicznym. Najprostsze stanowią roztwory soli, zaś te bardziej złożone zawierają dodatkowo m.in. związki wielkocząsteczkowe czy składniki biologicznie czynne. Również analizując skład chemiczny sztucznej śliny stosowanej w badaniach *in vitro* przez różnych autorów oraz dostępnych na rynku substytutów śliny stosowanych m.in. w terapii w jamie ustnej, można zauważyć duże zróżnicowanie ich składu i właściwości. Nadal różnią się one istotnie od naturalnej śliny, co wskazuje na potrzebę i zasadność prowadzenia badań naukowych w tym zakresie.

Przedstawiona do recenzji praca została wydana jako monografia Instytutu Inżynierii Biomedycznej Politechniki Białostockiej. Zawiera 185 stron i klasyczny układ obejmujący w pierwszym rozdziale przegląd literatury, który stanowi nieco powyżej 20% rozprawy. Kolejne trzy rozdziały dotyczą badań doświadczalnych i obejmują tezę wraz z celem pracy, metodykę oraz wyniki badań z dyskusją. Bibliografia obejmuje 348 pozycji literaturowych w większości z ostatnich lat, w tym trzy współautorskie publikacje Doktoranta. Rozprawa zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim, które zwięźle prezentuje jej istotę i zakres przeprowadzonych badań.

W części teoretycznej Autor scharakteryzował polimery, którym poświęcona została praca tj. polilaktyd i polikaprolakton. Przedstawił ich właściwości i zastosowanie, uwzględniając aplikacje w obrębie jamy ustnej. Następnie przeanalizował przebieg i czynniki wpływające na proces biodegradacji wybranych poliestrów alifatycznych, uwzględniając degradację hydrolityczną oraz degradację mikrobiologiczną, które będą stanowiły główny temat badań eksperymentalnych. W kolejnym podrozdziale scharakteryzował środowisko jamy ustnej. Opisał rolę i skład śliny oraz występujące w niej mikroorganizmy uczestniczące w formowaniu biofilmu. Przegląd literatury zakończył podsumowaniem, co ładnie spina i porządkuje przedstawione uprzednio zagadnienia, prowadząc do określenia założeń dotyczących części eksperymentalnej.

W rozdziale 2 Doktorant sformułował cele pracy: cel naukowy, jakim jest *przeprowadzenie badań procesów degradacji hydrolitycznej i mikrobiologicznej polilaktydu (PLA) i polikaprolaktonu (PCL) w środowisku sztucznej śliny* oraz cel użytkowy, jakim jest *opracowanie preparatu sztucznej śliny o korzystnych cechach biofunkcjonalnych*.

Określona została również teza pracy mówiąca, iż *procesy degradacji hydrolytycznej polilaktydu i polikaprolaktonu mogą być intensyfikowane w wyniku aktywności mikrobiologicznej środowiska jamy ustnej, a istotną rolę w tych procesach odgrywa tworzący się biofilm*. Zarówno teza, cel i zakres pracy zostały sformułowane poprawnie w skróconym sposobie.

Najobszerniejszą część rozprawy stanowią badania własne Doktoranta. Część tę podzielił On na trzy zasadnicze etapy: 1. opracowanie preparatu śliny, 2. inkubacja polimerów, 3. modyfikacja bazowego preparatu śliny.

Jak słusznie zauważa Autor pracy, czynnikiem warunkującym degradację biomateriałów w środowisku biologicznym jamy ustnej jest obecność śliny. Posiada ona określony skład chemiczny i biologiczny, z którym związane są m.in. lepkość, pH, podatność do tworzenia biofilmu czy mineralizacji związków nieorganicznych. Nie można też zapominać, że w warunkach naturalnych parametry środowiskowe ulegają okresowym zmianom spowodowanym np. zróżnicowaną temperaturą czy pH spożywanych pokarmów. Kolejnym czynnikiem są naprężenia mechaniczne, które w bardzo istotny sposób przyspieszają degradację implantów polimerowych. Jest to zatem zagadnieniem niezwykle szerokie i wymagające uwzględnienia wielu różnych czynników.

Jak już zostało wspomniane, Doktorant w swoich badaniach eksperymentalnych podjął się oceny wpływu symulowanego środowiska jamy ustnej na polilaktyd i polikaprolakton. Na podstawie analizy danych literaturowych opracował skład sztucznej śliny na bazie PBSu wzbogaconego w mucynę i gumę ksantanową. Przeprowadzone badania fizykochemiczne i reologiczne sztucznej śliny wykazały, że odznacza się ona podobieństwem do śliny naturalnej (która też została poddana badaniom) pod względem pH, napięcia powierzchniowego czy właściwości lepkosprężystych. Znacznie różni się natomiast przewodnością elektrolityczną, potencjałem redoks czy lepkością dynamiczną. Mimo stwierdzonych różnic Doktorant zdecydował się wykorzystać opracowaną sztuczną ślinę do inkubacji biomateriałów polimerowych. Aby oprócz degradacji hydrolytycznej możliwe było uwzględnienie degradacji mikrobiologicznej, w badaniach *in vitro* do sztucznej śliny wprowadzone zostały mikroorganizmy takie jak: grzyb *Candida spp.* oraz bakteria *Streptococcus mutans*. Wybór ten jest w pełni uzasadniony ze względu na ich obecność w jamie ustnej. Badania przeprowadzono zarówno w konfiguracjach monokulturowych oraz mieszanej, jak również w wyjściowej sztucznej ślinie oraz buforze PBS przy pH 2 lub 7 i temperaturze 37°C lub 42°C. Pozwoliło to na zgromadzenie bogatego materiału badawczego

do późniejszej analizy wpływu poszczególnych czynników środowiskowych na degradację biomateriałów. Przeprowadzone zostały badania właściwości fizykochemicznych, mechanicznych i termicznych materiałów, jak również dokonana ocena formowania biofilmu na ich powierzchni.

W ostatnim etapie pracy Doktorant podjął się modyfikacji składu opracowanej sztucznej śliny w celu nadania jej dodatkowych cech biofunkcjonalnych, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

Praca zakończona jest podsumowaniem oraz wnioskami, jakie wyciągnięto na podstawie przeprowadzonych badań doświadczalnych.

W ocenie recenzenta rozprawa doktorska zawiera oryginalne wyniki mogące znaleźć zastosowanie praktyczne, wśród których za najważniejsze można uznać:

1. Opracowanie sztucznej śliny o składzie i właściwościach reologicznych oraz fizykochemicznych zbliżonych do śliny naturalnej, wykazującej działanie przeciwgrzybicze i przeciwbakteryjne, równocześnie nie wywołującej hemolizy.
2. Określenie wpływu środowiska płynów fizjologicznych na degradację wchłanianych polimerów biomedycznych: polilaktydu i polikaprolaktonu.
3. Potwierdzenie tezy, że w wyniku aktywności mikrobiologicznej proces degradacji ulega intensyfikacji.

Strona redakcyjna pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Wyniki zostały przedstawione w poprawny sposób i poddane dyskusji z odniesieniem do wiedzy dostępnej w literaturze. Czytając jednak ostatni rozdział można odnieść wrażenie, że dane literaturowe dominują nad danymi eksperymentalnymi, i być może warto było część z nich zamieścić w przeglądzie literatury. Wprowadzenie pogrubionych nagłówków jako podrozdziałów do spisu treści, wg recenzenta, dałoby pełniejszy obraz, tego co zawiera praca. Również wprowadzenie indeksu oznaczeń i skrótów byłoby bardzo pomocne dla czytelnika w odbiorze treści. Ze względu na szeroki zakres badań i zmienną chronologię ich prezentacji oraz analizy, część skrótów opisanych uprzednio w tekście wymaga ponownego odszukiwania, co jest dość kłopotliwe. W pracy nie zawsze podane są też angielskie nazwy, od których pochodzi zastosowany skrót (np. AS, GX str.56, CLSM str.67).

Na pochwałę natomiast zasługują rysunki 3.1 i 4.44. Na pierwszym przedstawiono schematycznie algorytm badań doświadczalnych, na drugim zestawiono funkcje poszczególnych składników opracowanego preparatu śliny. Gdyby do rysunku 3.1 dołożyć opis i zdefiniować oznaczenie próbek i medium, być może pozwoliłoby to na spójne i konsekwentne stosowanie ich w dalszej części pracy. Przykładem takich rozbieżności mogą być oznaczenia medium z mikroorganizmami: na rys 4.16 medium opisane jest "C.krusei" i "C.k. + S.m", a na rysunku obok (rys. 4.17) "Candida spp." i "C.+ S.m", a jeszcze na kolejnych jest już tylko oznaczenie C (rys. 4.21, 4.27).

Autor w swojej pracy nie ustrzegł się nieprecyzyjnych lub błędnych pojęć, takich jak np. „inkubacja w biofilmie” zamiast „inkubacja w sztucznej ślinie z mikroorganizmami”, „rozpuszczanie łańcuchów” zamiast „zrywanie łańcuchów” (str.92), „kąć zwilżalności” zamiast „kąć zwilżania” (str.88), „roztwór kontaktowy” zamiast „płyn inkubacyjny” lub „medium imersyjne”, „kondycjonowanie próbek” zamiast „inkubacja próbek” (tu recenzent ma na myśli użycie tego pojęcia w badaniach *in vitro*).

Również pewien niedosyt budzi u recenzenta brak informacji dotyczących składu preparatów sztucznej śliny opracowanych przez innych autorów i stosowanych w badaniach *in vitro* oraz dostępnych na rynku przeznaczonych do celów terapeutycznych. Ponadto w podsumowaniu Doktorant pisze, że "*Opracowany model badawczy degradacji mikrobiologicznej wykorzystujący sztuczną ślinę zawierającą naturalne mucyny jest pierwszym tego typu rozwiązaniem, niespotykanym dotąd w literaturze.*" Może warto byłoby wskazać co stanowi nowość, skoro w literaturze można znaleźć przykłady sztucznej śliny zawierającej mucyny pochodzenia naturalnego np. w pracy Momma i wsp. czytamy o preparacie z mucynami pozyskiwanymi ze świńskich żołądków (Momm F. i wsp.: Different Saliva Substitutes for Treatment of Xerostomia Following Radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* 2005, 181, 231-236).

Bardzo pomocne dla czytelnika byłoby wyjaśnienie przed opisem prac doświadczalnych, co Doktorant ma na myśli mówiąc o biofunkcjonalności i wskazanie konkretnych właściwości sztucznej śliny jakie zamierza osiągnąć. Informacja taka pojawia się znacznie później przy omawianiu wyników badań.

Również czytając rozdział dotyczący degradacji polimerów u recenzenta nasuwało się pytanie dotyczące formującego się biofilmu, którego obecność została potwierdzona i opisana dopiero w kolejnym rozdziale. Gdyby odwrócić kolejność i zacząć od formowania się biofilmu, a następnie omówić degradację, może analiza wyników badań byłaby prostsza. I tutaj pojawia się wątpliwość dotycząca sprężystości i twardości warstwy wierzchniej: czy są to wyniki opisujące badany materiał czy raczej wyniki opisujące biofilm na powierzchni materiału? Czy nie warto byłoby dokładniej przyjrzeć się powierzchni wykorzystując mikroskop skaningowy z przystawką EDS, która umożliwiłaby analizę składu chemicznego. Możliwe byłoby wówczas stwierdzenie obecności zarówno związków organicznych, jak również związków mineralnych, których pojawienie się w tych warunkach jest bardzo prawdopodobne.

Moduł sprężystości polimerów można natomiast wyznaczyć w trakcie badań mechanicznych. Takie badanie daje uśrednioną wartość dla całego materiału, a nie ogranicza się do jego powierzchni. Te same testy mechaniczne pozwalają również określić odkształcalność tworzywa przy zniszczeniu oraz pracę zniszczenia, która z kolei powiązana jest z odpornością na pęknięcie (przywoływaną przez Doktoranta w dyskusji wyników str.117).

Biorąc pod uwagę, że oprócz wyjściowego składu polimeru również ich historia związana z przetwórstwem i sterylizacją jest niezwykle istotna z punktu widzenia budowy, właściwości i przebiegu degradacji, wskazane byłoby podanie warunków formowania wtryskowego m.in. temperatura, ciśnienie, rodzaj stosowanej wtryskarki (ślimakowa, tłokowa) oraz szczegóły dotyczące sterylizacji.

Oprócz powyższych uwag recenzent chciałby poznać odpowiedź na jeszcze kilka pytań:

- Z czego wynika różnica w potencjale redoks naturalnej śliny i bazowej sztucznej śliny opracowanej przez Doktoranta? Jaki to ma wpływ na biofunkcjonalność sztucznej śliny? Czy końcowa modyfikacja składu śliny wpłynęła na zmianę potencjału redox?
- Jak można tłumaczyć obserwowany spadek ilości biofilmu w czasie w kolejnych dniach eksperymentu?
- Jakiego przebiegu degradacji można spodziewać się w przypadku rusztowań (skafoldów) polimerowych?

Przedstawione w recenzji uwagi mają charakter dyskusyjny i w żaden sposób nie obniżają wartości pracy. Być może zainspirują one Autora do kontynuowania badań w podjętym temacie i doskonalenia warsztatu pracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest wartościowa i posiada aspekt praktyczny. Postawione cele zarówno naukowe, jak i aplikacyjne, zostały zrealizowane. Doktorant udowodnił, iż posiada opanowany warsztat naukowy i potrafi posługiwać się zróżnicowanymi metodami badań. Dobrą rekomendację mogą stanowić artykuły naukowe powstałe na kanwie pracy opublikowane w czasopismach z wysokim *impact factorem*.

W związku z powyższym uważam, że praca mgr. inż. Dawida Łysika pt: "Procesy degradacji wybranych biomateriałów polimerowych w środowisku sztucznej śliny" spełnia warunki określone przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę o dopuszczenie Pana mgr. inż. Dawida Łysika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Handwritten signature in blue ink, reading "Barbara Jankiewicz".