



Lublin, 15.03.2021 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Julii Higuchi

pt. „Biodegradable barrier membranes for tissue separation fabricated by means of electrospinning and ultrasonic coating with hydroxyapatite nanoparticles”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska **mgr inż. Julii Higuchi** została wykonana pod kierunkiem promotora Pana Prof. dr hab. Witolda Łojkowskiego, kierownika Laboratorium Nanostruktur Instytutu Wysokich Ciśnień PAN w Warszawie oraz promotora pomocniczego śp. Dr Giuseppino Fortunato, z Instytutu EMPA w St. Gallen w Szwajcarii. Zespół naukowy pod kierunkiem Pana Profesora od wielu lat z sukcesami zajmuje się syntezą proszków hydroksyapatytowych oraz badaniami strukturalnymi, fizykochemicznymi i biologicznymi nanomateriałów apatytowych w celu wykorzystania ich w medycynie. Z zaciekawieniem zapoznałam się więc z obecną dysertacją. Tematyka badawcza ocenianej pracy doktorskiej dotyczy opracowania produkcji membrany separacyjnej za pomocą elektroprzędzenia włókien oraz pokrywania nanocząstkami za pomocą ultradźwięków, z przeznaczeniem na materiał do wykorzystania w regeneracji tkanek przyzębia.

Przedstawioną do recenzji Dysertację doktorską stanowi opracowanie formatu A5, obejmujące 120 stron (po odjęciu stron tytułowych, życiorysu, listy patentów i publikacji). Ze względu na udział promotora pomocniczego spoza kraju dysertacja napisana jest w języku angielskim. Zawiera ona zalecany dla rozpraw doktorskich podział na części: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie, Przegląd piśmiennictwa, Część eksperymentalną (w tym: Materiały do produkcji i Charakterystykę metod), Wyniki, Dyskusję, Perspektywy, Podsumowanie, Piśmiennictwo oraz Załączniki zawierające pierwszą stronę europejskiego zgłoszenia patentowego w trybie PCT oraz ulotkę membrany. Zamieszczono również Wykaz skrótów stosowanych w dysertacji, Wykaz rycin i tabel oraz krótki życiorys doktorantki, listę patentów i zgłoszeń patentowych oraz publikacji.

W części wstępnej pracy Doktorantka dokonała szerokiego przeglądu piśmiennictwa naukowego dotyczącego ogólnej charakterystyki biomateriałów przydatnych do celów medycznych, a w szczególności biomateriałów przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej,



uwzględniając w tym biomateriały polimerowe. Doktorantka zwięźle podeszła do tematu chorób tkanek przyzębia i sposobów wczesnego leczenia paradontozy oraz zabiegów sterowanej regeneracji tkanek (GTR) i sterowanej regeneracji kości (GBR). Ważną częścią wprowadzenia w temat jest charakterystyka błon barierowych (separacyjnych), których celem jest ochrona miejsca ubytku po ekstrakcji zęba przed zasiedleniem przez komórki nabłonka. Doktorantka opisała krótko membrany nie biodegradowalne oraz szerzej biodegradowalne (polimerowe i kompozytowe) pod kątem składu, stabilności i biokompatybilności z otaczającym środowiskiem oraz obecności na rynku. Autorka duży nacisk w opisie położyła na wykazanie klinicznej potrzeby użycia błon separacyjnych w zabiegach stomatologicznych oraz na rosnące zapotrzebowanie rynkowe. Wykorzystana bibliografia obejmuje znaczną ilość cytowań i uwzględnia najnowsze publikacje z obszaru badawczego Doktorantki. Po analizie bibliograficznej zauważyć można, że badania nad nowymi biomateriałami służącymi do niwelowania ryzyka szybkiego zarostania zębodołów tkanką miękką są prowadzone w wielu ośrodkach naukowych, ze względu na aktualną potrzebę medyczną. W kontekście powyższego, podjęcie prac badawczych nad tworzeniem polimerowych materiałów na błony separacyjne było jak najbardziej słuszne, tym bardziej, że mają one duży potencjał wdrożeniowy. Tak więc, podsumowując rozdział *Literature review* manuskryptu, należy podkreślić właściwe dobranie treści wpisujących się w nurt zagadnień związanych z tworzeniem nowej generacji membran separacyjnych przez Doktorantkę, a część przeglądu dysertacji wskazuje, że Doktorantka dysponuje aktualną wiedzą z interesującego ją zakresu badawczego i oceniam to pozytywnie.

Następna część dysertacji to Część eksperymentalna (*Experimental Section*), dotycząca syntezy nanohydroksyapatytu, wyboru polimerów do tworzenia membran, opisu produkcji membran techniką elektroprzędzenia, opisu mechanizmu powlekania powierzchni polimerowych nanocząstkami HAp przy pomocy ultradźwięków. Ponadto znalazła się w tej części charakterystyka technik wykorzystanych do oceny morfologii wytwarzanych materiałów, struktury chemicznej, mapowania składu pierwiastkowego powierzchni, pomiaru powierzchni właściwej próbek. Wymienić tu można nowoczesne spektroskopowe techniki takie jak: SEM, FIB-SEM, FTIR, EDX, XPS, XRD, ICP-OES, WCA oraz metodę BET wykorzystaną do oceny powierzchni właściwej porowatych materiałów. Pod koniec Części



Eksperymentalnej (pkt. 3.2.3.13) zamieszczono opis oznaczenia metabolicznej aktywności komórek MG-63 i linii BJ. Dobór linii komórkowych do zaplanowanych eksperymentów biologicznych jest prawidłowy. Komórki MG-63 to komórki kostniako-mięsaka, posiadające fenotyp osteoblastów we wczesnej fazie różnicowania. Stanowią one dobry model komórek kostnych w badaniach *in vitro*. Komórki BJ to fibroblasty, które jak najbardziej są pożądane w kontekście badania membran jako separatorów dla komórek nabłonka. Dodam jednak do tego drobną uwagę: w opisie brakuje informacji o źródle pozyskania wymienionych linii i danych dotyczących laboratorium, w którym prowadzono te badania.

Podczas zapoznawania się z treścią *Experimental Section* nasunęły mi się jeszcze inne uwagi. Wg mojej oceny w Części Eksperymentalnej dysertacji powinny się znaleźć treści techniczne i metodologiczne dotyczące prowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów. Natomiast Autorka dysertacji, w większości przedstawiła w Części Eksperymentalnej ogólny przegląd materiałów i metod stosowanych w produkcji i charakteryzacji membran opierając się na dostępnym piśmiennictwie. Poza tym, nie wszystkie opisy metodyczne są jednoznaczne i dokładne, co wymaga ze strony Czytelnika poszukiwań danych np. w częściach Wyniki, czy też sięgania bezpośrednio do publikacji. Ze względu na zawarte w tej części treści przeglądowe, trudno czytelnikowi wyłonić z tekstu fragmenty należące *stricto* do pracy doktorskiej. Tak jest np. w większości sekcji 3.1. Uważam, że treści z podpunktu 3.2.2.1. pracy, opisujące metody wytwarzania membran, (w tym mechanizm elektroprzędzenia, wpływ różnych czynników na proces elektroprzędzenia) i część treści z podpunktów 3.2.2.3. i 3.2.2.4., dotyczące pokrywania powierzchni z użyciem ultradźwięków, to raczej ogólny przegląd wiedzy na wymieniony temat na podstawie piśmiennictwa (też i własnego - udział mgr inż. J. Higuchi). Myślę, że ta część z powodzeniem mogłaby się znaleźć w pkt 2 dysertacji (*Literature Review*). Ponadto, zauważa się, że Autorka nie zamieściła spisów: wykorzystanych odczynników, aparatury, użytych programów komputerowych i statystycznych, co zwykle zamieszczane jest w dysertacjach doktorskich. Własna procedura wytwarzania membran włóknistych (opisana w pkt 3.2.2.2) oraz sposób powlekania membran nanocząstkami HA z udziałem ultradźwięków (opisana w pkt 3.2.2.5) – istotne elementy pracy doktorskiej – zostały właściwie opisane i włączone w część ekperymentalną. Co do doboru technik analitycznych (SEM, FIB-SEM, FTIR, EDX, XPS, XRD, ICP-OES, WCA, BET) nie mam uwag i pozytywnie oceniam opis zawarty w pkt 3.2.3 pracy. Są to nowoczesne



metody stosowane powszechnie do oceny parametrów właściwych dla materiałów porowatych.

Poczynione przeze mnie uwagi dotyczące ocenianej części eksperymentalnej nie zmieniają dobrej opinii o całej części i mają raczej charakter uwag edytorskich.

Wyniki badań własnych obejmują ocenę morfologii polimerowych membran otrzymanych techniką elektroprzędzenia oraz ocenę ultradźwiękowego pokrywania membran nanocząsteczkami HA przy pomocy zaplanowanych technik wymienionych w części eksperymentalnej. Otrzymano błony, o strukturze włóknistej, wytworzone z mieszanki biodegradowalnych polimerów (PDLLA/PLGA), które następnie pokrywano cząstkami nanoHA. Wykorzystano dwa typy nanoHA – GoHAP3 i GoHAP6. Warto zaznaczyć, że Doktorantka we własnym zakresie produkowała nanocząsteczki HA, wykorzystując do tego opracowaną w zespole prof. W. Łojkowskiego metodę ich syntezy w wysokociśnieniowych reaktorach mikrofalowych. Wyniki badań wskazały, że pokrywanie polimerowych membran cząstkami nanoHA powoduje uzyskanie pozytywnych cech przez tak zmodyfikowane błony np. korzystną zwilżalność, dobre właściwości mechaniczne i korzystny poziom degradacji. Warto podkreślić, że warstwy nanocząstek na powierzchni błon mogą działać jako bariera ochronna przed szybką hydrolizą włókien polimerowych. Odkładanie się warstw nanohydroksyapatytu na membranach, poprzez wyjątkową nanoporowatość i topografię, wpływa na znaczny wzrost pola powierzchni właściwej błon, co wykazała Doktorantka. W założeniu, dzięki dużej porowatości, membrany mogą zapewnić *in vivo* przepływ składników odżywczych po implantacji w przyzębiu, co jest cechą niewątpliwie istotną. Pozytywnym efektem przeprowadzonych modyfikacji, jest uzyskanie przez błony PDLLA/PLGA/nHA korzystnych właściwości biologicznych, co potwierdzono w badaniach *in vitro*. Przede wszystkim eksperymentalnie wykazano dobre oddziaływanie separacyjne błon na komórki – nie zaobserwowano penetrowania fibroblastów w głąb włóknistej błony, przy jednoczesnym zasiedlaniu przez nie powierzchni materiału. Dodatkowo wykazano, że struktura błony złożona z wielu warstw mikrowłókien zapewniała dobrą przyczepność dla komórek kostnych (MG-63). Osiągnięte rezultaty wykazały więc, że cel pracy, dotyczący wytworzenia błony separacyjnej, został przez doktorantkę osiągnięty. W związku z powyższym Część badawczą pracy doktorskiej oceniam bardzo dobrze.



Jednakowoż mam drobną uwagę: w podpisach do figur 25, 26, 27, 28, 30, 33 C i D, 34 – należałoby napisać jakiego polimeru dotyczą obrazy. Podobnie podpisy do figur: 30, 37, 38, 39, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nie zawierają informacji, jaki typ nanoHA wykorzystano w tych eksperymentach.

Następna część dysertacji to **Dyskusja**. Zauważa się jednak, że ta część dysertacji nie jest jednak dyskusją własnych rezultatów z rezultatami innych autorów publikacji, dotyczącymi tematyki odpowiadającej pracy doktorskiej. Doktorantka raczej podsumowała, uzyskane w trakcie pracy, swoje wyniki eksperymentalne. W trakcie czytania tej części dysertacji nasunęło mi się, że w tym miejscu mogłoby się znaleźć np. porównanie niektórych istotnych własności (np. fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych) otrzymanych membran z własnościami kilku membran komercyjnych, dostępnych na rynku. Otrzymana na ten temat wiedza wzbogaciłaby całość rozprawy. Z pewnością takie informacje będą konieczne w przypadku ewentualnej przyszłej komercjalizacji produktu. Inwestorzy, zarówno branżowi jak i finansowi, zwykle porównują nowy produkt z produktami obecnymi na rynku pod kątem jakości – i stawiają pytanie – w czym nowy typ membrany jest lepszy od tych, które są używane obecnie.

W ocenie ogólnej pracy niewątpliwie można podkreślić, że praca jest koncepcyjnie interesująca i wykonawczo bardzo dobra. Uzyskane rezultaty mają wartości aplikacyjne, zwłaszcza w zakresie wdrażania biomateriału dla stomatologii. Autorka otrzymała membranę separacyjną na drodze nowoczesnych technik i wykazała korzystne zastosowanie w regeneracji tkanek przyzębia. Warto w tym miejscu podkreślić, że wymienione membrany barierowe zostały zgłoszone do ochrony patentowej w UP RP (2018 r) oraz w procedurze WIPO PCT (2019 r.).

Zaproponowany przez Doktorantkę dobór polimerów jako składników oraz opracowany sposób tworzenia błon polimerowych na drodze elektroprzędzenia, pozwolił na otrzymanie mocnych membran włóknistych o korzystnej strukturze i kontrolowanym czasie degradacji oraz na ich modyfikację nanocząstkami HA poprzez użycie ultradźwięków. Zaznaczyć należy, że uzyskanie pożądanych właściwości poprzez optymalizację całego procesu wytwarzania podniosło wartość terapeutyczną zmodyfikowanego biomateriału. Aby



spełnić wymagania, co do zastosowania nowego typu membran w zabiegach sterowanej regeneracji tkanek (GTR) i sterowanej regeneracji kości (GBR) należy jednak przeprowadzić szereg badań biologicznych *in vitro* oraz *in vivo* zgodnie z normami ISO, o czym wspomina Doktorantka w części *Outlook* (Perspektywy). Zakłada Ona, że będą podjęte badania przedkliniczne i kliniczne z udziałem wytworzonych membran wg *Good Manufacturing Practice*. Wymienione przeze mnie w recenzji uwagi są raczej z grupy edytorskich i nie zmieniają mojej bardzo dobrej opinii o pracy doktorskiej mgr Julii Higuchi.

Podsumowując: stwierdzam, że Pani mgr Julia Higuchi zrealizowała postawione cele badawcze. Praca wpisuje się w aktualny nurt badań dotyczących nowych technologii służących do opracowania membrany separacyjnej o przeznaczeniu medycznym i zawiera istotne elementy nowości naukowej. Przedstawiona do oceny praca doktorska (biorąc pod uwagę wartości poznawcze i praktyczne pracy) wykazuje, że realizując z sukcesem cel badawczy, Doktorantka posiada doświadczenie i umiejętności prowadzenia badań na wysokim poziomie. Ponadto należy podkreślić także bardzo dobrą działalność publikacyjną i patentową mgr inż. Julii Higuchi. Jest Ona współautorką 6 publikacji, w tym w 4-ech jest pierwszym autorem oraz współautorką kilku patentów i zgłoszeń patentowych polskich i zagranicznych.

Po analizie całej dokumentacji z przekonaniem stwierdzam, że **Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Julii Higuchi spełnia, według mojej opinii, wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 r (dz. U. Nr. 65, poz. 595 z 16 kwietnia 2003 r z późniejszymi zmianami) „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**