

dr hab. inż. Barbara Szaraniec, prof. AGH

Kraków, 7 września 2023 r.

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA

IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

Katedra Biomateriałów i Kompozytów

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Karoliny Mazur**

pt.: **"Biodegradowalne antybakteryjne kompozyty polimerowe o zwiększonej wytrzymałości mechanicznej do zastosowań na elementy sprzętu medycznego"**

w dyscyplinie **inżynieria materiałowa**

na zlecenie Rady Naukowej Wydziału Inżynierii Materiałowej i Fizyki

Politechniki Krakowskiej, uchwała z dnia 14.06.2023 r.

(pismo I-0.215.2023 z dnia 5.07.2023 r.)

Przedstawiona praca doktorska Pani mgr inż. Karoliny Mazur dotyczy tematyki kompozytów degradowalnych stanowiących ekologiczną alternatywę dla popularnych tworzyw sztucznych mogących znaleźć zastosowanie w sektorze medycznym.

Opracowanie lekkich, tanich, bezpiecznych dla człowieka i środowiska materiałów, posiadających dobre właściwości mechaniczne jest bardzo ważnym zagadnieniem badawczym ostatnich lat. Wysokorozwinięte branże takie jak: wojskowa, lotnicza czy medyczna korzystają z rozwiązań materiałowych opartych w dużej mierze na kompozytach. Poprzez dobór rodzaju, postaci i ilości składników, można wyeksponować zalety materiałów składowych, jednocześnie eliminując ich wady. Szczególnie atrakcyjne są kompozyty o osnowach polimerowych. Ze względu na ich niski koszt, dostępność i łatwość

formowania możliwe jest otrzymywanie wyrobów o zróżnicowanych kształtach, kolorach i formach. Ogromną zaletą jest również niski ciężar właściwy oraz w przypadku zastosowania wzmocnienia w postaci włókien ciągłych, najwyższe wartości wytrzymałości właściwej. Zależnie od pełnionej funkcji i pojawiających się potrzeb aplikacyjnych, kompozytom polimerowym można w stosunkowo prosty sposób nadawać dodatkowe właściwości, takie jak: fluorescencja, zmiana koloru lub kształtu pod wpływem określonego bodźca, bioaktywność, działanie antybakteryjne itp.. Również wykorzystując na osnowy tworzywa degradable możliwe jest sterowanie czasem życia wyrobu i kinetyką jego degradacji.

Podjęty w niniejszej pracy temat jest zatem bardzo aktualny i perspektywiczny. Pojawiające się nowe polimery i dodatki, rozwijająca się wiedza techniczna, medyczna czy biologiczna, pozwalają opracowywać coraz bardziej zaawansowane wielofunkcyjne materiały kompozytowe, bazujące również na surowcach naturalnych.

Doktorantka podjęła się otrzymania szerokiej gamy kompozytów, których osnowę stanowiły tworzywa termoplastyczne: (PLA) polilaktyd lub (PHBV) kopolimer poli(3-hydroksymaślan-ko-3-hydroksywalerianian). Jako fazę modyfikującą zastosowano degradable materiały roślinne, takie jak: cząstki rozdrobnionej kukurydzy lub włókna drzewne, oraz dwa rodzaje niedegradowalnych napełniaczy, jakimi były: pozyskane z naturalnych surowców włókna bazaltowe oraz syntetyczne włókna aramidowe. Wielość wytworzonych, a następnie przebadanych rodzajów kompozytów, wynika z wprowadzania różnych udziałów napełniaczy oraz z tworzenia kompozytów hybrydowych (z dwoma różnymi dodatkami). Aby uzyskać działanie antybakteryjne tworzyw, przeprowadzona została również ich modyfikacja dodatkami bakteriobójczymi, takimi jak srebro lub tlenek miedzi.

Przedstawiona do recenzji praca zawiera 145 stron, na które składa się siedem rozdziałów. Napisana jest w klasycznym układzie obejmującym przegląd literatury, który stanowi niespełna 20% rozprawy (rozdziały 1-3). Rozdział 4 zawiera tezę naukową i cel pracy. Kolejne trzy rozdziały dotyczą badań doświadczalnych i obejmują, metodykę oraz wyniki badań z dyskusją. Na bibliografię składa się 131 pozycji literaturowych w większości z ostatnich lat, w tym cztery współautorskie publikacje Doktorantki. Rozprawa zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim, w którym przedstawiono istotę i zakres przeprowadzonych badań.

W pierwszym rozdziale pracy zatytułowanym *Wstęp* znajduje się wprowadzenie w tematykę tworzyw sztucznych, ich krótka historia, rozwój, obecne oczekiwania prawne

i społeczne wobec tej gałęzi przemysłu. Wskazując na potrzebę opracowywania nowych materiałów, pozyskiwanych z surowców odnawialnych, posiadających dodatkowe funkcje użytkowe, w tym przypadku działanie antybakteryjne, ulegających degradacji w bezpieczny i zaplanowany sposób, Doktorantka przedstawia swoją propozycję materiałów kompozytowych, którym poświęcona będzie część doświadczalna. Możemy znaleźć tu bardzo cenny schemat poszczególnych etapów badań realizowanych w pracy z podziałem na cztery grupy materiałowe oraz wprowadzoną symbolikę oznaczeń (choć niestety niejednorodną i niepełną). Często taki schemat w pracach pojawia się na etapie omawiania materiałów i metody wytwarzania próbek, jednak i to miejsce, do którego można powracać w trakcie lektury (co Recenzent wielokrotnie czynił) jest dobre. Dla usystematyzowania i ułatwienia odbioru treści warto byłoby również przedstawić wykaz skrótów i oznaczeń używanych w pracy. Co prawda w tabeli 5.2 w części eksperymentalnej, która jest bardzo obszerna i zajmuje aż 3 strony pracy, pojawiają się oznaczenia próbek (skądinąd spójne i logiczne), jednak forma przedstawienia składu opracowanych kompozytów jest mało czytelna, zawiera błędy, a same oznaczenia nie są używane konsekwentnie w dalszym tekście rozprawy. Przykładowo, zamiast przyjętej na oznaczenie kukurydzy litery C (tabela 5.2), w wynikach i ich analizie mamy literę K (rozdział 6.3), zamiast zaproponowanego oznaczenia włókien bazaltowych jako B, pojawia się niewyjaśniony skrót BW (zapewne od *Bazaltowe Włókna*), a zamiast zaproponowanego oznaczenia W dla mączki drzewnej stosowany jest skrót WF (zapewne od ang. *Wood Fiber*). Nie są to może istotne uchybienia, ale niepotrzebnie utrudniają lekturę, zwłaszcza, że pojawiają się wśród badanych materiałów kompozyty hybrydowe i skrót BW można mylnie odczytać jako hybrydę włókien bazaltowych i drzewnych.

W dalszej części pracy Doktorantka dokonuje szerszego przeglądu literatury tematu. Omówione zostały biokompozyty polimerowe z uwzględnieniem ich pochodzenia i trwałości. Pojawia się wiele odniesień do badań tworzyw i kompozytów, jakie prowadzone są na świecie oraz innych badań własnych Autorki. Należy uznać je za wskazane i cenne dla uzasadnienia kierunku i celowości prowadzonych w dalszym etapie prac eksperymentalnych. Stosowane wypełniacze są ukazane jako elementy kompozytów mogące poprawić właściwości mechaniczne, głównie moduł sprężystości, oraz obniżyć cenę wyrobów z biotworzyw (która nadal jest znacznie wyższa niż z tworzyw tradycyjnych). Szkoda, że właściwości różnych rodzajów kompozytów obecnych w najnowszej literaturze, z uwzględnieniem zastosowanych napelniaczy i osnów, nie zostały zebrane w formie

graficznej (np. tabeli lub grafu). Taka forma na pewno ułatwiłaby porównanie różnych materiałów oraz wskazanie najbardziej obiecujących kierunków badań.

Drugi temat przedstawiony w części teoretycznej dotyczył właściwości antybakteryjnych materiałów. Omówione zostały głównie nanocząstki: srebra oraz dwutlenku miedzi, czyli dodatki mające zostać zastosowane w części doświadczalnej rozprawy. Podobnie jak poprzednio Autorka zamieściła odniesienia do prac eksperymentalnych innych badaczy, mających na celu nadanie tworzywom właściwości bakteriobójczych. Wskazała również uzasadnienie potrzeby opracowywania i wytwarzania wyrobów o takich właściwościach. Pewien niedosyt u Recenzenta budzi jednak brak analizy działania różnych form srebra uwzględniających jego skuteczność względem różnych szczepów bakterii. Jest to o tyle istotne, że wprowadzona do kompozytu nanocząstka, niekoniecznie nanocząstką pozostanie, a otrzymany kompozyt *de facto* nie będzie nanokompozytem. W inny sposób na drobnoustroje działają nanocząstki srebra, jony srebra czy srebro metaliczne. Natomiast podrozdział zatytułowany *Właściwości antybakteryjne dwutlenku miedzi* w rzeczywistości w bardzo niewielkim zakresie dotyczy tlenku miedzi (II), a raczej opisuje zastosowanie metalicznej miedzi. Sama Autorka pisze: *Kolejny metalem, który ma właściwości antybakteryjne jest miedź. Jony miedzi uwalniają jednowartościowe lub dwuwartościowe jony, które uszkodzają ścianę komórkowa bakterii (...)*. Rzeczywiście znane jest w literaturze antybakteryjne działanie miedzi, podczas gdy tlenek miedzi (II) wykazuje działanie grzybobójcze. Nasuwa się pytanie czy Doktorantka nie pomyliła tych dwóch materiałów o czym mogłoby świadczyć kolejne zdanie: *Tlenek miedzi jest metalem półprzewodnikowym o wyjątkowych właściwościach ...?*

Uzupełnieniem części teoretycznej mógłby być rozdział poświęcony tytułowemu elementom sprzętu medycznego. Przedstawienie wyrobów biomedycznych, jakich wykonanie z opracowywanych kompozytów Doktorantka rozważa oraz określenie wymagań mechanicznych czy biologicznych, jakie im stawia, pomogłyby lepiej zrozumieć zasadność przeprowadzanych badań, jak również pozwoliłyby określić kryteria doboru odpowiedniego materiału kompozytowego.

W rozdziale czwartym sformułowana została teza pracy, która mówi, iż: *celowym i koniecznym jest wytworzenie różnorodnych elementów jednorazowego użytku sprzętu medycznego z biodegradowalnych przyjaznych dla środowiska kompozytów polimerowych o zwiększonych właściwościach antybakteryjnych.*

Doktorantka określiła również cele pracy: cel naukowy, jakim jest *ocena oddziaływań między poszczególnymi składnikami kompozytów w odniesieniu do polimerowej osnowy oraz wpływu antybakteryjnych dodatków na zmianę cech struktury (krystaliczność), a przez to na zmianę ich właściwości wytrzymałościowych* oraz cel użyteczny, jakim jest *opracowanie składu kompozytów na osnowie biodegradowalnych polimerów charakteryzującego się podwyższonymi właściwościami wytrzymałościowymi oraz antybakteryjnością niezbędną do zachowania wysokich standardów leczenia stosowanych na jednorazowe elementy sprzętu medycznego.*

Najobszerniejszą część rozprawy stanowią badania własne Doktorantki. Część eksperymentalna rozpoczyna się od charakterystyki materiałów użytych w pracy, sposobu i warunków wytworzenia próbek kompozytowych oraz metod przeprowadzonych badań. Niektóre badania zostały opisane dokładnie, dla innych podano jedynie numery norm wg których zostały zrealizowane. Ponieważ normy często dają szeroki zakres możliwości oznaczenia właściwości jakich dotyczą, nie jest jednoznaczne, jak przebiegało rzeczywiste badanie. Przykładem mogą być oznaczenia chłonności, które prowadzono według normy ISO 62. Można znaleźć w niej wymagania, co do kształtu, rodzaju medium immersyjnego, czasu i warunków inkubacji (24, 48, 96 i 192 h) oraz oznaczanych parametrów. Po przeczytaniu informacji w normie nadal jednak trudno samemu stwierdzić jakie warunki wybrano w tym przypadku i na ile odpowiadają one temu, co zawarto w wytycznych.

Metody badań wybrane do realizacji postawionych w pracy celów są zasadne. Analiza termiczna (DSC, TG), mechaniczna (statyczna próba rozciągania i zginania, udarność), termomechaniczna (DMTA), obserwacje mikroskopowe (SEM) oraz ocena biogodności i bakteriobójczości, ze względu na przeznaczenie opracowanych kompozytów, pozwalają na charakterystykę i porównanie ich właściwości. Bardzo ciekawe i użyteczne z punktu widzenia praktycznych zastosowań wyrobów z materiałów termoplastycznych jest określenie właściwości mechanicznych w różnych/skrajnych temperaturach pracy (-24°C, 23°C, 80°C). Jest to szczególnie ważne dla elementów narażonych na zmiany temperatury podczas użytkowania i pozwala na bardziej świadomy wybór kompozycji włókno/osnowa w konkretnym zastosowaniu. Oprócz czynników temperaturowych wyroby stosowane w medycynie często narażone są na działanie innych czynników, które mogą wpłynąć na ich właściwości podczas sterylizacji, diagnostyki czy rehabilitacji (np. promieniowanie jonizujące, rentgenowskie, UV, pole magnetyczne, środki chemiczne/dezynfekujące).

Dlatego rozważając wykonanie elementów sprzętu medycznego, warto je rozpatrzeć w kolejnym etapie prac, jeśli będą takowe kontynuowane.

Wyniki badań przedstawiono według chronologii powstawania próbek, w założonych czterech etapach. Jako pierwsze zbadane zostały kompozyty z dodatkami antybakteryjnymi srebrem i tlenkiem miedzi (II) w osnowach PLA i PHBV. Wbrew stosowanej nazwie *nanocząstki srebra* Autorka podaje, że średnica cząstek wynosi 5-15 μ m, co wskazuje, że aktywność biologiczna, jaką posiadają, odpowiada raczej tej dla metalicznego srebra, niż dla znacznie bardziej aktywnych nanocząstek. Dodatkowo „zamknięcie” cząstek srebra w nieresorbowalnej osnowie polietylenowej może ograniczyć ich oddziaływanie ze środowiskiem i wpłynąć jedynie na zmianę ładunku powierzchniowego kompozytu (co też może mieć znaczenie w odpowiedzi mikrobiologicznej). Zastosowany tlenek miedzi (II) również występuje w postaci mikrometrycznych cząstek o nieco większej średnicy (30-50 μ m). Wprowadzenie dodatków do degradablealnych osnów nie wpłynęło na właściwości mechaniczne otrzymanych kompozytów, jak również na sposób ich degradacji. Wszystkie materiały przy zaproponowanej przez Doktorantkę zawartości dodatków antybakteryjnych (tj. 2% mas. Ag i 0,2% mas. CuO) nie wykazywały cytotoksyczności. Założone działanie bakteriobójcze nie zostało osiągnięte, niemniej jednak w przypadku dodatku srebra, daje się zauważyć pewną aktywność względem bakterii dla obu rodzajów kompozytów tzn. zarówno z osnową z PLA i PHBV. Możliwe byłoby uznanie kompozytów za bakteriostatyczne, jednak należałoby to potwierdzić odnosząc się do odpowiednich norm. Zasadne w tym przypadku jest określenie minimalnego stężenia hamującego dodatku, MIC (*ang. Minimum Inhibitory Concentration*) i wyznaczenie tzw. *okna terapeutycznego* (tzn. bezpiecznej ilości dodatku, który nie wpływa negatywnie na komórki, a działa hamująco lub niszcząco na bakterie). W pewnym zakresie Dyplomantka próbowała w swoich badaniach zrealizować to zadanie oceniając wpływ cząstek Ag na fibroblasty i komórki śródbłonna, jednak na podstawie tych badań nie wskazała bezpiecznego stężenia.

Kolejne badania dotyczyły kompozytów z biodegradablenymi napełniaczami roślinnymi w postaci mączki drzewnej i cząstek kukurydzy oraz niedegradablenymi włóknami: bazaltowymi i aramidowymi. Napełniacze różniły się swoim pochodzeniem, budową i składem chemicznym. Niestety nie zostały one szczegółowo scharakteryzowane, co utrudnia późniejszą analizę wyników dla wytworzonych kompozytów z ich udziałem. I tak na przykład nie jest wiadome jaką postać i wielkość posiadała rozdrobniona kukurydza,

z jakiej części rośliny i w jaki sposób została pozyskana (z kolby), jaki jest jej skład? jaką średnicę i rozwinięcie powierzchni miały stosowane włókna? W udzieleniu odpowiedzi na powyższe pytania, w dużej mierze pomocne byłyby obserwacje mikroskopowe.

Wytworzone kompozyty zawierały od 5 do 15% mas. napelniaczy. Poza wspomnianymi dwufazowymi układami włókno-osnowa, zbadano również układy hybrydowe tj. trójfazowe, w których w osnowie znalazły się dwa rodzaje napelniaczy. Tym samym, głównym tematem badawczym stała się ocena wpływu ilości i rodzaju/rodzajów wprowadzonych cząstek i/lub włókien na właściwości kompozytów (m.in. moduł, wytrzymałość, udarność, trwałość). W tej części pracę można uznać za wysoce metodyczną. Konsekwentnie realizowane są kolejne zaplanowane badania dla kolejnych rodzajów kompozytów. Patrząc na konstrukcję spisu treści można odnieść wrażenie, że opracowanie przypomina raport z badań. Co prawda, Autorka odnosi się do wyników z prac innych badaczy, jednak bywa, że brakuje wyjaśnienia pojawiających się zmian i ich oceny w kontekście postawionych celów.

Praca zakończona jest wnioskami, jakie wyciągnięto na podstawie przeprowadzonych badań doświadczalnych oraz wskazaniem kierunków dalszych badań. Cel poznawczy został zrealizowany i dokonano *oceny oddziaływań między poszczególnymi składnikami kompozytów, wyjaśniając ich wpływ na właściwości otrzymanych materiałów*. Cel użyteczny jakim było *opracowanie składu kompozytu charakteryzującego się podwyższonymi właściwościami wytrzymałościowymi oraz antybakteryjnością* został zrealizowany częściowo, gdyż nie wytworzono, ani nie podano składu kompozytu, który łączyłby obie te cechy.

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

1. Opracowanie biodegradowalnych kompozytów hybrydowych o różnym czasie degradacji i właściwościach, w zależności od zastosowanej osnowy i napelniaczy.
2. Określenie wpływu różnych rodzajów napelniaczy naturalnych i sztucznych na właściwości kompozytów z ich udziałem z uwzględnieniem temperatur pracy w zakresie od -24°C do $+80^{\circ}\text{C}$.

Strona redakcyjna pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Wyniki w większości zostały przedstawione w poprawny sposób i poddane dyskusji z odniesieniem do wiedzy dostępnej w literaturze. Wprowadzenie pogrubionych lub w inny sposób wyróżnionych nagłówków

uczyniłoby tekst bardziej przejrzystym. Jak już wcześniej wspomniano, wprowadzenie indeksu oznaczeń i skrótów byłoby bardzo pomocne dla czytelnika w odbiorze treści rozprawy.

Autorka w swojej pracy nie ustrzegła się błędów edycyjnych i językowych (zwłaszcza stylistycznych i interpunkcyjnych). Przykładowo na wykresach (rys. 6.15) znajdują się nieopisane osie (bez wielkości i jednostek), na rys. 6.11 zostały połączone punkty pomiarowe, czego w tym przypadku zrobić nie można. Podawanie dokładności oznaczeń do dwóch miejsc po przecinku np. w procentowych zmianach jakiegoś parametru (str. 59) albo w wytrzymałości podanej w MPa (str. 62) nie ma sensu fizycznego, a sprawia, że praca jest mniej klarowna. Zdarzają się również błędne lub nieprecyzyjne pojęcia np. "komórki leczone stężeniami srebra"(str. 53), "cząsteczki kukurydzy" (str. 94) czy "hybrydyzacja włókien bazaltowych z kukurydzą" (str. 115).

Oprócz powyższych uwag Recenzent chciałby poznać odpowiedź na kilka dodatkowych pytań:

1. Na jakiej podstawie dobierano ilości napełniaczy? Czy prace eksperymentalne zostały poprzedzone szacunkowymi obliczeniami np. modułu sprężystości? Czy przeprowadzono analizę geometrii dodatków tzn. czy są to cząstki, płytki, włókna krótkie (wg definicji) - jest to kluczowe dla obliczeń właściwości kompozytu i dobrania odpowiednich zależności?
2. Co miały na celu badania komórkowe prowadzone na fibroblastach i komórkach śródbłonna? Jaka linię fibroblastów zastosowano (skórne czy inne)? Czy rzeczywiście była to linia pierwotna, skoro podano producenta/dostawcę? Dlaczego nie zastosowano literowego oznaczenia fibroblastów analogicznie jak dla komórek śródbłonna - HUVEC zapewne od ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*? Dlaczego wybrano akurat takie linie?
3. Dlaczego działanie antybakteryjne będące tematem pracy przeprowadzono jedynie względem jednego szczepu bakterii gram ujemnych *Escherichia Coli*? Zwykle pełne badania normowe obejmują badania zarówno na szczepach Gram ujemnych i Gram dodatnich (np. *Staphylococcus Aureus*).
4. Na jakiej podstawie Doktorantka twierdzi, że spadek masy podczas degradacji hydrolitycznej jest spowodowany *pękaniem łańcuchów polimerowych i postępującą degradacją materiału*? Czy zostały przeprowadzone jakieś badania potwierdzające skracanie łańcuchów (na przykład masy cząsteczkowej)?

5. Doktorantka często odnosi się do zwilżalności tworzyw, czy oznaczano właściwości powierzchni materiałów, takie jak: wspomniana zwilżalność, energia powierzchniowa lub chropowatość? Byłoby to cenne w kontekście oddziaływania kompozytów z komórkami czy z płytkami krwi, jak również w analizie właściwości mechanicznych kompozytów na podstawie oceny oddziaływania na granicy faz cząstka/osnowa, włókno/osnowa.

6. Jaka była dawka promieniowania jonizującego zastosowana do sterylizacji próbek? Czy sterylizację radiacyjną można uznać za bezpieczną metodę wyjaławiania tego typu materiałów? Wątpliwości Recenzenta pojawiają się w związku z tym, że typowa dawka 25 kGy może istotnie wpłynąć na degradację polimerów, a dawka niższa może być niewystarczająca, aby skutecznie wysterylizować materiał.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest wartościowa i posiada niewątpliwie aspekt praktyczny. Postawione cele zarówno naukowe, jak i aplikacyjne, zostały zrealizowane. Doktorantka udowodniła, iż posiada opanowany warsztat naukowy i potrafi posługiwać się zróżnicowanymi metodami badań.

W związku z powyższym uważam, że praca mgr inż. Karoliny Mazur pt.: *Biodegradowalne antybakteryjne kompozyty polimerowe o zwiększonej wytrzymałości mechanicznej do zastosowań na elementy sprzętu medycznego* spełnia warunki określone przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Mazur do dalszych etapów przewodu doktorskiego.