

Prof. dr hab. inż. Agnieszka Sobczak-Kupiec  
Katedra Inżynierii Materiałowej  
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki  
Al. Jana Pawła II 37  
agnieszka.sobczak-kupiec@pk.edu.pl  
tel. 12 628 34 48

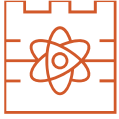
Kraków, dn. 07.01.2025

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgr Adama Byrskiego**  
**pt. „Bioaktywne implanty, specyficzne dla pacjenta, zapewniające trwałą**  
**rekonstrukcję funkcjonalną”**

Recenzja została wykonana na podstawie pisma nr DP.520.7.2024 Zastępcy Dyrektora ds. Ogólnych Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk, dr hab. Anny Wierzbickiej-Miernik, prof. Instytutu, z dnia 06.11.2024r.

Rozprawa doktorska mgr. Adama Byrskiego została zrealizowana pod kierunkiem dr. hab. inż. Romana Majora, prof. Instytutu oraz dr hab. Katarzyny Kasperkiewicz. Na uwagę i podkreślenie zasługuje fakt, że badania realizowane przez Doktoranta zostały sfinansowane w ramach projektów M-ERA.NET2/2019/7/2020 pt. „Bioaktywne, specyficzne dla pacjenta, implanty palców, dla trwałej odbudowy funkcjonalnej po amputacji” o akronimie „fingerIMPLANT”, współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju; Austriacką Agencję Badań i Promocji (FFG), grant nr 878515 oraz w ramach Programu STER - Umiejdzynarodowienie Szkół Doktorskich, projekt nr PPI/STE/2020/1/00020, finansowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA).

Zakres pracy wpisuje się w nowoczesną tematykę badań, realizowanych w wiodących ośrodkach naukowych zarówno polskich jak i zagranicznych z zakresu tytanowych materiałów implantacyjnych. Temat pracy doktorskiej Pana mgr. Adama Byrskiego dotyczący bioaktywnych implantów specyficznych dla pacjenta, zapewniających trwałą rekonstrukcję funkcjonalną, jest niezwykle aktualny i istotny w dzisiejszych czasach. Badania te odpowiadają na rosnące zapotrzebowanie na spersonalizowane rozwiązania medyczne, które są dostosowane do indywidualnych potrzeb pacjentów, szczególnie po amputacji palców. W związku z tym podjęcie przez Doktoranta tematu tworzenia warstw na powierzchni



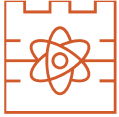
implantacyjnych stopów tytanowych do rekonstrukcji palców jest w pełni uzasadnione i wpisuje się w aktualny nurt badań.

### **Ogólna charakterystyka rozprawy i ocena merytoryczna**

Rozprawa doktorska mgr. Adama Byrskiego została przygotowana w układzie standardowym, typowym dla prac doktorskich. Pierwsza część pracy przedstawia stan wiedzy w przedmiocie badań, po której następuje prezentacja celu i zakresu badań, opisu materiałów i metod badawczych, prezentacja i analiza uzyskanych wyników, a także rozdział zawierający wnioski. Do dysertacji dołączono suplement obejmujący zestawienie zmian zaobserwowanych w czasie badania sekcyjnego w grupach badanych oraz ocenę histopatologiczną organów zwierząt doświadczalnych w grupach badanych.

Recenzowana rozprawa doktorska liczy 134 strony i obejmuje: przegląd stanu wiedzy i techniki (15 stron), założenia i cel pracy (1 strona), badania własne z dyskusją wyników wraz z podsumowaniem (83 strony), oraz spis cytowanej literatury obejmujący 163 pozycje, który uwzględnia aktualne publikacje naukowe związane z obszarem tematycznym rozprawy.

Część literaturowa dysertacji obejmuje przegląd stanu wiedzy na temat epidemiologii amputacji palców, problematyki replantacji, materiałów stosowanych do rekonstrukcji utraconych palców, zastosowania metod przyrostowych w produkcji implantów kości, problematyki zakażeń bakteryjnych, jak również modyfikacji powierzchni biomateriałów stosowane w celu zapobiegania infekcjom w implantologii. Przegląd literatury kończy opis prototypów implantów kości palców. W opinii recenzenta przegląd literaturowy byłby pełniejszy przy szerszym omówieniu charakterystyki stopów tytanu oraz ceramiki cyrkonowej i fosforanowo-wapniowej, które to materiały Doktorant stosował w swoich badaniach. W przeglądzie literatury można byłoby również uwzględnić i szerzej omówić metody nanoszenia warstw ceramicznych, w tym wykorzystywaną metodę natryskiwania plazmowego. Praca doktorska mgr. Adama Byrskiego koncentruje się na bioaktywnych implantach specyficznych dla pacjenta, przeznaczonych do trwałej rekonstrukcji funkcjonalnej po amputacji palców. Amputacje te są poważnymi urazami, które wywołują znaczące konsekwencje funkcjonalne i psychologiczne, stanowiąc wyzwanie chirurgiczne. W pracy podkreślono postęp technologii w zakresie inżynierii materiałowej i medycyny, co umożliwia tworzenie biomateriałów nowej generacji przy użyciu metod przyrostowych, pozwalających na indywidualne dopasowanie implantów do pacjenta. Stopy tytanu, takie jak Ti-6Al-4V, są szeroko stosowane ze względu na ich wytrzymałość mechaniczną, odporność na korozję i biokompatybilność. Przegląd literaturowy zwięźcza wskazanie celu pracy oraz też



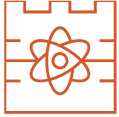
badawczych dysertacji. Praca obejmuje badania powierzchni nad możliwością modyfikacji materiałów, aby poprawić ich właściwości mechaniczne, biologiczne i antybakteryjne. Jako główny cel pracy wskazano modyfikację powierzchni cienkowarstwowych materiałów tytanowych oraz ceramicznych przeznaczonych do rekonstrukcji kości palców, która miała za zadanie zmienić ich strukturę i topografię powierzchni, co powinno przełożyć się na ich właściwości mechaniczne, biologiczne i antybakteryjne.

Jako cele produktowe realizowanej pracy doktorskiej, które mają doprowadzić do osiągnięcia celu głównego wskazano hasłowo m.in. skład fazowy oraz topografia powierzchni, w tym mikro- i makrostruktura, cytotoksyczność względem komórek fibroblastów, właściwości mechaniczne i podatność na zużycie, właściwości antybakteryjne, prototyp implantów i badania biomechaniczne, zweryfikowane właściwości biologiczne z użyciem modeli zwierzęcych. Tak wskazane cele są dosyć ogólnie sformułowane i wskazują raczej na planowane do realizacji badania.

Uważam, że przedstawiona w pierwszej części rozprawy analiza stanu techniki stanowiła dobrą podstawę do rozpoczęcia badań. Mimo nielicznych skrótów myślowych przyjętych przez Autora można stwierdzić, że wywiązał się z tego zadania z powodzeniem. W opinii recenzenta przegląd literatury byłby pełniejszy przy uwzględnieniu wymagań dla implantów tytanowych i odniesienie się np. do norm m.in. ASTM F1472 – specyfikacja dla stopów tytanu, wanadu i aluminium do zastosowań w implantach chirurgicznych czy ISO 5832 Implanty chirurgiczne – materiały metalowe. Wskazane mankamenty mają jedynie charakter redakcyjny i nie wpływają negatywnie na ogólny odbiór pracy.

W ramach pracy doktorskiej zbadano materiały wytwarzane metodami przyrostowymi: stop Ti-6Al-4V oraz ceramikę z tlenku cyrkonu utwardzanego tlenkiem glinu (ATZ 20), poddano różnym obróbkom powierzchniowym, aby wpłynąć na ich strukturę, a tym samym na właściwości biologiczne i mechaniczne. Próbkę miały formę dysków o średnicy 13 mm i wysokości 2 mm, a prototypy do testów biomechanicznych miały kształty zbliżone do stawów palczkowych. Wykonano symulacje numeryczne oraz modele fizyczne z tworzywa sztucznego, a następnie za pomocą CNC stworzono docelowe prototypy implantów kostnych ze stopu Ti-6Al-4V. Próbkę ze stopu Ti-6Al-4V wytwarzano metodą laserowej fuzji proszkowej, a próbki ceramiczne ATZ20 technologią litografii. Obróbki powierzchniowe obejmowały wyżarzanie, pokrywanie hydroksyapatytem, HAp z cynkiem oraz trifosforanem wapnia metodą napyłania plazmowego, anodowanie oraz elektropolowanie.

W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej skupiono się na analizie topografii powierzchni, mikrostruktury oraz składu chemicznego materiałów wytwarzanych



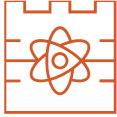
metodami przyrostowymi, stopu Ti-6Al-4V i ceramiki ATZ 20. Do wykonania zdjęć powierzchni użyto cyfrowego mikroskopu świetlnego oraz laserowego konfokalnego mikroskopu skaningowego. Mikrostrukturę oceniano przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego Themis. Analizy fazowe przeprowadzono z użyciem dyfraktometru Bruker D8 Discover.

Właściwości mechaniczne i trybologiczne próbek oceniano za pomocą urządzenia Step 500 wyposażonego w moduły NHT3 i MCT3, które spełniają wymagania norm ASTM i ISO dla testów twardości i zużycia. Pomiar nanotwardości oraz modułu Younga przeprowadzono przy użyciu końcówki Berkovicha. Współczynnik tarcia i wskaźnik zużycia wyznaczono przy użyciu korundowej kulki, która była dociskana do powierzchni próbki i poruszała się ruchem posuwisto-zwrotnym. Rejestrowano siłę tarcia i obliczano współczynnik zużycia na podstawie uśrednionego pomiaru pola przekroju poprzecznego śladu ścierania.

Szczegółowe badania umożliwiły ocenę struktury, właściwości mechanicznych i trybologicznych materiałów, co ma znaczenie dla ich zastosowania w implantologii i innych dziedzinach wymagających wysokiej precyzji i jakości materiałów.

Badania biogodności materiałów obejmowały analizy biochemiczne, mikrobiologiczne oraz eksperymenty na modelach zwierzęcych. W ramach analiz biochemicznych wykonano testy cytotoksyczności bezpośredniej i pośredniej, oceniając wpływ materiałów na komórki za pomocą różnych markerów, takich jak dehydrogenaza mleczanowa (LDH) i cytokiny prozapalne. Materiały badano pod kątem ich właściwości antybakteryjnych metodami kontaktowymi i pośrednimi, używając szczepów *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Przeprowadzono także testy wykrywania żywych mikroorganizmów za pomocą chlorku trifenyloctetrazolowego (TTC) oraz analizy hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (FISH), aby ocenić wzrost mikroorganizmów na powierzchni badanych biomateriałów. Analizy mikrobiologiczne obejmowały ocenę wzrostu mikroorganizmów na materiałach, badanie przylegania endotoksyn bakteryjnych oraz ocenę mikrobiologiczną próbek po deplatacji. Przeprowadzono także testy wykrywające aktywność drobnoustrojów i poziomy endotoksyn bakteryjnych na różnych materiałach. Badania na modelach zwierzęcych zgodne z normą ISO 10993 obejmowały ocenę toksyczności podostrej, skutków miejscowych po implantacji oraz analizę histopatologiczną tkanek. Tkanki zwierząt badano pod kątem zmian patologicznych, a surowicę krwi analizowano na obecność enzymów i innych markerów biochemicznych, takich jak ALAT, ASPAT, kreatynina, mocznik, białko całkowite i dehydrogenaza mleczanowa.

Wyniki wykazały różnice w odpowiedzi biologicznej na różne materiały, co ma znaczenie dla ich potencjalnego zastosowania w implantologii i medycynie regeneracyjnej.



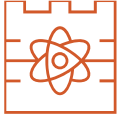
Analizy wykazały, że niektóre materiały mogą mieć lepsze właściwości antybakteryjne i biokompatybilność, co może wpływać na ich skuteczność jako implantów medycznych. Przedstawiony materiał badawczy stanowi ciąg przyczynowo-skutkowy prowadzący do osiągnięcia głównego celu badań. Generalnie metody badawcze zostały odpowiednio dobrane do celu i zakresu pracy. Dyskusja wyników badań własnych została podzielona na obszary, gdzie przedstawiono szczegóły w zakresie prowadzonych prac eksperymentalnych, która została zwieńczona podsumowaniem i wnioskami. Praca zawiera bardzo obszerny materiał doświadczalny, a badania *in vivo* stanowią niezwykle ważny element dysertacji.

Ogólnie praca została przygotowana w sposób jasny i czytelny, a materiał badawczy jest adekwatny do celu i zakresu pracy. Nie mam zastrzeżeń co do sposobu opracowania i przygotowania dysertacji. Strona graficzna jest poprawna. Przedstawione rysunki, wykresy i tabele są czytelne, również strona językowa dysertacji jest poprawna. Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam, że przedstawiony materiał jest wartościowy i wnosi wiele istotnych informacji w zakresie modyfikacji warstwy wierzchniej stopów tytanu z przeznaczeniem do zastosowań na materiały implantacyjne. Ogólnie, nie mam zastrzeżeń odnośnie przyjętych metodyk badawczych, sposobu wykonania eksperymentów, przedstawienia i dyskusji uzyskanych wyników. Uważam także, że przedstawiona w pracy teza badawcza została sformułowana poprawnie, a postawione cele zostały osiągnięte. Materiał przedstawiony w poszczególnych rozdziałach stanowi ciekawe opracowanie.

Główne wnioski płynące z pracy Pana mgr. Adama Byrskiego dotyczą bakteryjnych infekcji okołoprotezowych, gdzie biofilmy bakteryjne odgrywają kluczową rolę w adhezji i odporności na antybiotyki. W badaniach wykazano również, że neutralizacja endotoksyn jest istotnym czynnikiem wpływającym na bezpieczeństwo kliniczne biomateriałów. Doktorant analizował skuteczność różnych powłok antybakteryjnych na powierzchni implantów, z uwzględnieniem ich wpływu na zapobieganie infekcjom, jak również właściwości materiałów, które wpływają na adhezję bakterii i formowanie biofilmów, co ma istotne znaczenie dla projektowania implantów. Doktorant zaproponował również nowoczesne metody zwalczania biofilmów, w tym zastosowanie nieantybiotykowych środków przeciwdrobnoustrojowych.

Wyniki badań stanowią znaczący materiał o charakterze aplikacyjnym i dobrze korelują z założonym celem i koncepcją pracy. Chciałabym, aby Doktorant odniósł się do następujących kwestii w ramach dyskusji naukowej:

1. Jakie są zalety i wady stosowania metody laserowej fuzji proszkowej w produkcji implantów ze stopu Ti-6Al-4V?

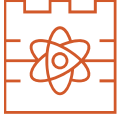


2. Jakie były różnice w strukturze i właściwościach biologicznych pomiędzy próbkami Ti6Al-4V i ATZ 20 po obróbce powierzchniowej?
3. Czy metoda napylania plazmowego była skuteczna w poprawie przylegania powłok do próbek ATZ 20?
4. Testy cytotoksyczności bezpośredniej Doktorant wykonywał z użyciem ludzkich fibroblastów dermalnych (ang. Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDF), na jakiej podstawie została wytypowana wskazana linia komórkowa.
5. Jaką sterylizację zastosowano dla materiałów do badań *in vivo*?
6. Jednym z wniosków Doktoranta jest, że powłoka HAp i HAp/Zn wykazuje kontaktowe właściwości antybakteryjne. Powszechnie znane jest antybakteryjne działanie cynku, proszę o wyjaśnienie na czym polega działanie antybakteryjne w przypadku powłoki z HAp bez zawartości cynku.
7. Jakie wyzwania i ograniczenia napotkano podczas przeprowadzania badań i jakie rekomendacje można wyciągnąć na przyszłość w zakresie badań biomateriałów?

### Ocena końcowa

Praca Pana mgr. Adama Byrskiego zawiera obszerny materiał badawczy jak i wnioski o charakterze aplikacyjnym. W szczególności wnioski dotyczące skuteczności powłok antybakteryjnych na implantach oraz wpływu właściwości materiałów na adhezję bakterii są istotne dla dalszych badań i praktyki klinicznej. Praca omawia również nowoczesne metody zwalczania biofilmów bakteryjnych, co może mieć bezpośrednie zastosowanie w medycynie. Dodatkowo, przedstawiono rekomendacje dotyczące minimalizacji ryzyka związanego z endotoksynami, co jest kluczowe dla bezpieczeństwa pacjentów korzystających z implantów. Podjęty w rozprawie problem badawczy jest w pełni trafny i oryginalny, ma znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne. Przyjęte przez Doktoranta cele zostały zrealizowane w sposób poprawny. Przyjęte metody badawcze oraz forma przedstawienia wyników badań były poprawne. Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością aktualnego wiedzy, metodologii badań oraz metod badawczych, a także bardzo dobrym wykorzystaniem źródeł literaturowych i prowadzenia dyskusji naukowej. W podsumowaniu charakterystyki ogólnej pracy mgr. Adama Byrskiego należy stwierdzić, iż mimo nielicznych uwag recenzenta, posiada ona niezbędne elementy wymagane w rozprawach doktorskich. Reasumując, przedstawione wyżej uwagi i zapytania należy traktować raczej jako łatwe do usunięcia usterki, które nie obniżają wartości merytorycznej pracy i mogą być pomocne w przyszłej publikacji wyników pracy naukowej Doktoranta. W podsumowaniu pragnę podkreślić, że sposób zaplanowania





**Politechnika Krakowska**  
Wydział Inżynierii  
Materiałowej i Fizyki



badan, forma przedstawienia wyników oraz ich analiza świadczą o wysokich kompetencjach naukowo-badawczych Doktoranta oraz o Jego właściwym przygotowaniu do pracy naukowej. Prezentowana praca wnosi istotny wkład w badania nad modyfikacją warstwy wierzchniej stopów tytanu do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej.

Praca spełnia wymagania art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. A. Krupkowskiego PAN z prośbą o dopuszczenie pana mgr. Adama Byrskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę aktywność naukową Doktoranta, na którą składają się publikacje z listy JCR o znaczącym współczynniku oddziaływania, aktywne uczestnictwo w projektach badawczych oraz dojrzałość naukową zwracam się do Rady Naukowej Instytutu z wnioskiem o wyróżnienie.

Z poważaniem,