



Poznań, 20.03.2025 r.

dr hab. Radosław Mrówczyński, prof. UAM
Wydział Chemii UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań
www.antlab.amu.edu.pl

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej **mgr inż. Ewy Rybak** pt. „Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą nanoprecypitacyjną, ocena ich właściwości do zastosowani jako potencjalne nośnik leków”, napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Tomasza Ciacha oraz dr. Jakuba Trzcńskiego.

PODSTAWA: Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej z dnia 17.12.2024 r. RNDIch.12a-5.2024 oraz pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej prof. dr hab. inż. Tomasza Sosnowskiego.

1.TEMATYKA PRACY

Ostatnie dwie dekady to niewątpliwie czas, ogromnego rozkwitu nanotechnologii. Materiały w nanoskali pozwoliły na osiągnięcie znaczącego postępu w dziedzinie projektowania i wytwarzania sensorów reagujących na anality chemiczne oraz biologiczne, technik obrazowania, a także nowoczesnych materiałów o podwyższonej odporności chemicznej na korozję oraz wyjątkowych właściwościach mechanicznych.

Jednak największe oczekiwania wobec nanomateriałów, zapowiadane już w przełomowym wykładzie prof. Richarda Feynmana "There's Plenty of Room at the Bottom", wiążą się z ich zastosowaniem w medycynie, a szczególnie w onkologii. Poczynione postępy w inżynierii materiałowej i nanotechnologii, umożliwiły precyzyjne projektowanie nanomateriałów o ściśle kontrolowanych właściwościach, co doprowadziło do powstania szerokiej gamy nanometrycznych nośników leków. Wśród nich można wymienić nanocząstki złota, tlenków żelaza, materiały węglowe (ze szczególnym uwzględnieniem nanorurek, grafenu i nanodiamentów) oraz liczne nanokompozyty. Ze względu na swoją biokompatybilność,

stosunkowo łatwą syntezę oraz możliwość dalszej funkcjonalizacji, nanocząstki polimerowe stanowią szczególnie interesującą grupę nanomateriałów, przykuwającą uwagę wielu grup naukowych w Polsce i na świecie, tworząc solidne podstawy dla rozwijającej się nanomedycyny.

Aby nanocząstki polimerowe mogły skutecznie pełnić rolę nośników leków, kluczowe jest zrozumienie procesu syntezy polimerowych nanostruktur oraz jego precyzyjna kontrola. Poprzez kontrolę procesu syntezy możemy otrzymywać polimerowe nanocząstki o określonym kształcie, rozmiarze, ładunku powierzchniowym oraz stabilności w różnych mediach biologicznych. Umiejętność kontrolowania tych parametrów jest istotna, gdyż bezpośrednio wpływają one na cytotoksyczność nanocząstek, ich zdolność wnikania do komórek oraz interakcje z transportowanymi lekami i układami biologicznymi.

W swojej pracy mgr inż. Ewa Rybak podjęła się badań nad syntezą nanocząstek polimerowych na bazie polikaprolaktonu – szeroko stosowanego polimeru zarówno w nanotechnologii, jak i w biomateriałach. Doktorantka przedstawiła pogłębioną analizę wpływu kluczowych parametrów syntezy na właściwości fizyczne otrzymywanych nanomateriałów oraz uwzględniła sposób prowadzenia procesu na te właściwości. Dodatkowo wykorzystwała modelowanie obliczeniowe, aby przewidzieć rozmiar nanomateriałów i zestawiał uzyskane dane teoretyczne z wartościami eksperymentalnymi.

Biorąc pod uwagę rosnące zainteresowanie systemami dostarczania leków opartymi na nanomateriałach, można stwierdzić, że badania doktorantki wpisują się w aktualną i istotną tematykę naukową. Jej praca dotyczy kluczowych aspektów technologicznych syntezy nanomateriałów, które mogą mieć realny wpływ na ich przyszłe zastosowania w praktyce medycznej.

2. OCENA MERYTORYCZNA

Recenzowana praca została przygotowana w formie klasycznej rozprawy doktorskiej. Składa się z siedmiu zasadniczych części. Główna część pracy została poprzedzona wykazem skrótów i listą symboli oraz zawiera opis osiągnięć naukowych doktorantki. Pierwsza część dysertacji obejmuje wstęp, w którym przedstawiono opis teoretyczny niezbędny do zgłębienia tematyki syntezy nanomateriałów metodą nanoprecypitacji. Następnie autorka przedstawia cele swojej pracy doktorskiej oraz opisuje część eksperymentalną. W czwartym rozdziale doktorantka prezentuje wyniki badań eksperymentalnych. Rozdział piąty zawiera krótkie

podsumowanie, po którym następuje opis modelu matematycznego. Ostatni, siódmy rozdział stanowi główne podsumowanie pracy. Dysertacja została opatrzona spisem rysunków i tabel. Ostatnią częścią rozprawy jest obszerna bibliografia obejmująca blisko 230 pozycji. Cytowane źródła są dobrze dobrane tematycznie i pochodzących z międzynarodowych czasopism o uznanej renomie. Piśmiennictwo w większości bazują na doniesieniach z lat 2017–2023.

Wprowadzenie do tematyki pracy doktorskiej jest stosunkowo obszerne i zawiera szczegółowy opis mechanizmu precypitacji oraz kluczowych parametrów wpływających na efektywność procesu i rozmiar nanocząstek. Dalej przedstawione są główne techniki charakterystyki nanocząstek i ich podstawy teoretyczne. W tym zakresie czuję pewien niedosyt, ponieważ doktorantka dość dobrze opisała metodę dynamicznego rozpraszania światła, natomiast skaningowa mikroskopia elektronowa została przedstawiona w sposób bardzo lakoniczny. W mojej ocenie należałoby to ujednolicić. Należy zauważyć, że doktorantka opisała jedynie techniki wykorzystywane w swojej pracy, co nie wyczerpuje zakresu metod niezbędnych do pełnej charakterystyki nanomateriałów.

Chociaż tekst przygotowany przez doktorantkę czyta się całkiem dobrze i nie zauważyłem większych edytorskich, to niektóre sformułowania są dość niezręczne językowo. Przykładem może być zdanie: „Zbadano nanoprecypitację w celu wytworzenia szerokiego spektrum składników hydrofobowych (.....)” czy chociażby pierwsze zdanie: „Metodę nanoprecypitacji, nazwaną także wypieraniem rozpuszczalnika PCL NP PCL NP. wykazują wysoki stopień tolerancji komórkowej i zdolność do efektywnego wychwyty przez modelowe linie komórkowe, co sugeruje ich przydatność w inżynierii biomedycznej i terapii ukierunkowanej [1], [2], po raz pierwszy opisali Fessi i in. w 1989 r. [3].” To zdanie należałoby uprościć. Tego typu konstrukcji w pracy jest więcej, ale nie będę ich wszystkich przytaczał. Jednak z recenzenckiego obowiązku wskazuję na ich występowanie.

W części opisowej brakuje odniesienia do stanu wiedzy na temat syntezy nanocząstek polikaprolaktonu oraz wyników uzyskiwanych przez inne grupy badawcze. Uwzględnienie tych informacji pozwoliłoby doktorantce na lepsze umiejscowienie swojej pracy w kontekście dotychczasowych badań i precyzyjniej opisać swoje osiągnięcia. Doktorantka również nie ułatwia czytelnikowi niezaznajomionemu z zagadnieniami syntezy nanomateriałów i systemów dostarczania leków pełnego zrozumienia idei enkapsulacji magnetycznych



nanocząstek w nanocząstkach PCL oraz potrzeby zastosowania otrzymywanych przez nią nanocząstek PCL w systemach dostarczania leków.

Cel sformułowany przez doktorantkę jest jasny i dobrze określony, a przeprowadzone badania miały na celu jego osiągnięcie. Hipotezy badawcze również zostały poprawnie sformułowane.

W kolejnych rozdziałach swojej pracy doktorantka opisała wyniki szeroko zakrojonej analizy wpływu stosunku rozpuszczalników, dodatku surfaktantu (sprawdzono różne typy surfaktantów oraz etapy, na których był dodawany) oraz sposobu odparowywania rozpuszczalnika na rozmiar otrzymywanych cząstek PCL oraz indeks polidispersyjności. Doktorantka zbadła, jak połączenie fazy organicznej i wodnej, czy to przez jednorazowe wstrzyknięcie, dozowanie kroplami lub w układzie mikroprzepływowym, wpływa na rozmiar otrzymywanych nanomateriałów.

W mojej ocenie zwłaszcza ta trzecia metoda jest szczególnie istotna i wpisuje się w nurt nowoczesnej chemii materiałów, w której kontrolowanie procesu syntezy nanostruktur z wykorzystaniem systemów mikrofluidycznych jest szczególnie ważne.

Główną metodą pomiarową stosowaną przez doktorantkę w celu sprawdzenia ww. parametrów reakcji na rozmiar otrzymywanych materiałów było dynamiczne rozpraszanie światła. Choć liczba przeprowadzonych eksperymentów i uzyskanych wyników jest bardzo duża, a uzyskane wyniki są ważne dla zrozumienia i kontrolowania procesu otrzymywania nanocząstek PCL, to sposób opisu wyników nie jest klarowny. Doktorantka posługuje się trzema różnymi metodami syntezy nanocząstek PLC, tj. bezpośrednim wstrzyknięciem, dozowaniem kropli i wykorzystaniem układu mikroprzepływowego. W opisie wyników syntezy nanomateriałów nie znalazłem informacji dla której z metod przedstawiono wyniki w rozdziałach 4.2, 4.3 i 4.4. Dopiero w rozdziale 4.5 doktorantka podaje rozmiary nanocząstek PCL uzyskanych z wykorzystaniem modelu mikroprzepływowego. Nie jest też dla mnie jasne, jaką metodą otrzymywano polimery opisane w następnych rozdziałach. Dlatego proszę o ustosunkowanie się doktorantki do tej kwestii podczas publicznej obrony rozprawy.

W tej części rozprawy uważam za istotne wykazanie przez doktorantkę, że do procesu otrzymywania nanocząstek PCL można wprowadzić surfaktant po odparowaniu rozpuszczalnika organicznego, co pozwoliło na przyspieszenie procesu oczyszczania i stabilizację nanomateriałów, unikając nadmiernego pienienia się próbek.

Analizując przedstawione wyniki, można zauważyć, że doktorantka nie zestawiała uzyskanych rozmiarów promienia hydrodynamicznego nanocząstek PCL z rozmiarami uzyskanymi innymi technikami, takimi jak SEM (skaningowa mikroskopia elektronowa). Bardzo proszę o odpowiedź dlaczego? Czy podjęto próby wyznaczenia rozmiarów nanocząstek na podstawie zdjęć uzyskanych przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej? Jaką metodą zostały przygotowane zobrazowane polimery. Na stronie 110 autorka pisze następujące zdanie: „...a przy wysokich powiększeniach wiązka elektronów może wywołać lokalne nagrzewanie nanocząstek. To prowadzi do ich topnienia lub deformacji, co utrudnia uzyskanie wiarygodnych obrazów oraz dokładną ocenę ich morfologii”. Moje pytania są następujące: Czy doktorantka rozważała pokrycie nanocząstek PCL warstwą metalu, np. złota lub mieszaniny złoto-pallad? Czy uważa to za dobry pomysł? Czy pod wpływem elektronów rzeczywiście dochodzi do nagrzewania się próbki i jej topnienia, czy raczej do jej degradacji? Skąd mogą brać się problemy ze skupieniem wiązki i rozmywaniem się obrazu podczas pomiaru?

W następnym rozdziale doktorantka przedstawiła wyniki uwalniania barwnika fluorescencyjnego – fluoresceiny oraz wartości EE i DL dla nanocząstek PCL. Tu ponownie brakuje sprecyzowania, jaką metodą i w jakich warunkach otrzymano materiał wykorzystany w tych eksperymentach oraz jaki był jego rozmiar.

Panie mgr inż. Ewa rybak przeprowadziła badania, pozwalające na określenie cytotoksyczności wybranych nanomateriałów, korzystając z metody MTT. Jest to metoda często stosowana i dobrze znana w badaniach biologicznych nanomateriałów. Zastanawia mnie jednak wysokie stężenie nanocząstek PCL wykorzystane w tych eksperymentach. Proszę o zweryfikowanie, czy rzeczywiście podano komórkom nanocząstki w stężeniu aż 10 mg/ml. Co kierowało doktorantką przy wyborze właśnie linii MG63 oraz L929?

Doktorantka podjęła także próby enkapsulowania magnetycznych nanocząstek wewnątrz nanocząstek PCL. Rozdział ten jest krótki, jednak bardzo interesujący, dlatego proszę doktorantkę, w ramach ciekawości naukowej, o predykcję możliwych dalszych działań badawczych związanych z tym podejściem i zastosowaniem tego materiału.

Ważnym rozdziałem, wnoszącym szczególną wartość dodaną do recenzowanej pracy, jest rozdział 6, w którym doktorantka przedstawiła założenia modelu numerycznego opartego na modelu Lebouille.

Przedstawione przez Doktorantkę podsumowanie jest treściowe i klarowne, a co najważniejsze - zgodne z obszerną częścią merytoryczną pracy i przedstawionymi w niej wynikami.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczam:

- Zrozumienie wpływu kluczowych parametrów syntezy nanocząstek PCL metodą nanoprecypitacji, takich jak stężenie polimeru, typ surfaktantu, temperatura procesu oraz typ i stosunek rozpuszczalników na wielkość otrzymywanych nanocząstek i ich jednorodność.
- Wykazanie przewagi THF nad mieszaniną DCM/DMSO w kontekście kontroli rozmiarów nanocząstek PCL.
- Opracowanie metody mikroprzepływowej syntezy nanocząstek PCL.
- Wykazanie wyższości surfaktantu Pluronic® F-127 nad Tween-80 jako odczynnika zapewniającego stabilność otrzymanych nanocząstek PCL oraz wskazanie optymalnego etapu jego dodania do nanocząstek w procesie oczyszczania nanocząstek, co pozwoliło na usprawnienie metody w bez utraty jakości materiału.
- Opracowanie modelu numerycznego procesu nanoprecypitacji opartego na równaniach dyfuzji i koalescencji, pozwalającego na optymalizację procesów przeniesienia technologii

3.DOROBK NAUKOWY

Na dotychczasowy dorobek publikacyjny pani mgr inż. Ewy Rybak składa się jeden artykuł opublikowany w czasopiśmie *Polymers* oraz dwa rozdziały w polskojęzycznych monografiach. Drugi artykuł jest w recenzji, więc można domniemywać, że ukaże się w najbliższym czasie. Doktorantka jest także współautorką dwóch innych artykułów naukowych opublikowanych w międzynarodowych czasopismach, choć nie są one związane z główną tematyką jej pracy doktorskiej. Lekki niedosyt czuję w kwestii wystąpień konferencyjnych. Doktorantka deklaruje jedynie dwukrotny udział w tej samej cyklicznej konferencji w Warszawie. Częstszy udział w konferencjach pozwoliłby doktorantce na zdobycie doświadczenia w zakresie prezentowania wyników swoich badań na szerszym, a także stworzyłby możliwość zdobycia nowej wiedzy w obszarze syntezy polimerowych nanomateriałów i nawiązania nowych kontaktów naukowych.



W tym miejscu należy podkreślić, że pani mgr inż. Ewa Rybak jest laureatką Nagrody Dziekana Wydziału Inżynierii Chemicznej za wybitne osiągnięcia naukowe w semestrze zimowym roku akademickiego 2023/2024 oraz otrzymała stypendium projakościowe dla najlepszych doktorantów Wydziału Inżynierii Chemicznej Politechniki Warszawskiej.

Chciałbym również zaznaczyć jej pracowitość, gdyż doktorantka była zaangażowana w realizację aż czterech grantów finansowanych zarówno ze środków własnych wydziału jak i Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (3 projekty). Mam nadzieję, że wyniki uzyskane przez nią podczas pracy w tych projektach ujrzą w najbliższym czasie światło dzienne w postaci nowych publikacji. Patrząc na praktyczne aspekty projektów nie można wykluczyć zgłoszeń patentowych i patentów czego serdecznie życzę.

W związku z powyższym oceniam dorobek doktorantki jako dobry na tym etapie kariery naukowej.

4. WNIOSKI

Podsumowując, stwierdzam jednoznacznie, że przygotowana przez panią mgr inż. Ewę Rybak rozprawa pt. „Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą nanoprecypitacyjną, ocena ich właściwości do zastosowania jako potencjalne nośnik leków” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm), w związku z czym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej z wnioskiem o nadanie mgr inż. Ewie Rybak stopnia doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna.