

Prof. dr hab. inż. Agata Markowska-Szczupak
Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
Al. Piastów 42, pok. 25
71-065 Szczecin
tel. +48 91 449 41 55

Szczecin, 28.01.2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.:

„Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą nanoprecypitacji, ocena ich właściwości do zastosowania jako potencjalnych nośników leków”

wykonanej przez

mgr inż. Ewę Rybak

pod opieką

Promotora: prof. dra hab. inż. Tomasza Ciacha

Promotora pomocniczego: dra inż. Jakuba Trzecińskiego

1. Podstawa formalna wykonania recenzji

Podstawą opracowania recenzji jest uchwała RNDICH.12a-4.2024 i pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej prof. dra hab. inż. Tomasza Sosnowskiego z dnia 19 grudnia 2024 r., w sprawie powierzenia mi obowiązków recenzenta rozprawy doktorskiej pt. „Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą nanoprecypitacji, ocena ich właściwości do zastosowania jako potencjalnych nośników leków”, wykonanej przez mgr inż. Ewę Rybak.

2. Podstawowe informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zatytułowana „Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą nanoprecypitacji, ocena ich właściwości do zastosowania jako potencjalnych nośników leków” została przedłożona przez Panią mgr inż. Ewę Rybak w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych, w dyscyplinie inżynieria chemiczna. Rozprawa została wykonana na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej pod opiekę promotora profesora dra hab. inż. Tomasza Ciacha oraz promotora pomocniczego dra inż. Jakuba Trzecińskiego.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Ewy Rybak ma formę klasycznej monografii napisanej w języku polskim. Dysertacja liczy 152 strony i składa się z siedmiu rozdziałów. Otwiera ją streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz wykorzystywanych skrótów i symboli. Następnie krótkie wprowadzenie po którym zamieszczono przegląd literatury, obejmujący 52 strony. W kolejnych rozdziałach przedstawiono cele i założenia pracy, zestawienie metod i materiałów, uzyskane wyniki, opis wykorzystanego modelu oraz dyskusję. Rozprawę kończy syntetyczne podsumowanie. Całość rozprawy zamyka spis materiałów i sprzętu użytego w badaniach, wykaz rysunków i tabel oraz bibliografia. Dysertację Doktorantka uzupełniła o zestawienie osiągnięć naukowych, w tym publikacji związanych i niezwiązanych z rozprawą, listę projektów, aktywność konferencyjną, listę nagród oraz działalność obejmującą opiekę nad studentami.

Stronę edytorską i graficzną rozprawy uważam za poprawną. Praca jest bogato ilustrowana (54 rysunki i 14 tabel) oraz posiada prawidłową strukturę.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Opracowanie innowacyjnych systemów dostarczania leków należy do najważniejszych tematów badawczych i aplikacyjnych współczesnej medycyny. Może się przyczynić do wdrożenia nowych strategii leczenia chorób, które wcześniej nie dawały się leczyć, spowodować zwiększenie skuteczności terapeutycznej istniejących leków lub zminimalizować ich szkodliwe efekty uboczne.

Nanotechnologia od lat należy do najszybciej rozwijających się dziedzin badań naukowych, która stwarza możliwości otrzymywania najnowszej generacji materiałów o niespotykanych wcześniej właściwościach. Nanocząstki mogą być projektowane tak, aby miały specyficzne właściwości powierzchniowe, które pozwolą na selektywne celowanie w chore komórki, przy jednoczesnym unikaniu zdrowych. Zastosowane jako nośniki leków, pozwalają na kontrolę procesu uwalniania terapeutycznego w czasie, co znacząco może zwiększać skuteczność terapii. Nanocząstki mogą być również wykorzystywane do celów diagnostycznych, takich jak środki kontrastowe w obrazowaniu medycznym lub do wykrywania określonych związków w próbkach biologicznych.

Ogromny potencjał polimerowych nanocząsteczek w zakresie dostarczania leków wynika z możliwości kontroli ich właściwości fizykochemicznych (np. rozmiaru, kształtu, powierzchni, ładunku itp.), zdolności poruszania pomiędzy barierami biologicznymi, selektywnego ukierunkowania terapii na komórki nowotworowe lub skutecznego uwalniania terapeutycznego w odpowiedzi na bodźce wewnętrzne i zewnętrzne. Jednak pomimo tych niezwykłych zalet, zastosowanie nanocząstek polimerowych w terapiach klinicznych jest niewielkie. Wynika to z istnienia szeregu wyzwań projektowych, związanych z uproszczeniem metod otrzymywania, zmniejszeniem kosztów wytwarzania czy brakiem modeli umożliwiających optymalizację procesów wywarzania lub badań związku pomiędzy ich funkcją, a złożonym środowiskiem biologicznym, z którym nieuchronnie będą się stykać.

Biorąc powyższe pod uwagę tematyka rozprawy doktorskiej, zaproponowana przez Panią mgr inż. Ewę Rybak doskonale wpisuje się w aktualne nurty badawcze inżynierii chemicznej, która coraz częściej integruje się z nanotechnologią umożliwiając projektowanie nanomateriałów o pożądanych właściwościach, przeznaczonych do praktycznych zastosowań. Sprzyja to rozwojowi zarówno nowych, tańszych i bardziej ekologicznych metod syntezy

nanocząstek, jak i modeli numerycznych, pozwalających na przewidywanie parametrów procesowych oraz przeniesienie technologii z poziomu laboratoryjnego do skali przemysłowej.

W części literaturowej rozprawy Doktorantka omówiła wiele aspektów inżynierskich dotyczących mechanizmu precypitacji i parametrów mających wpływ na jej przebieg. Ponadto opisała wybrane techniki charakteryzowania nanocząstek oraz sposoby enkapsulacji i uwalniania substancji z ich wnętrza.

Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej przygotowanej przez Panią mgr inż. Ewę Rybak było opracowanie metody syntezy biozgodnych nanocząstek polimerowych, przeznaczonych do transportu leków.

W części doświadczalnej rozprawy Pani mgr inż. Ewa Rybak omówiła w jaki sposób zostały dobrane polimery, rozpuszczalniki i surfaktanty, stosowane w procesach nanoprecypitacji. Doktorantka, szczegółowo opisała metody syntezy nanocząstek polimerowych na bazie polikaprolaktonu. Przedstawiła również sposób enkapsulacji fluoresceiny w nanocząstkach, metodykę badań jej uwalniania oraz testów cytotoksyczności, prowadzonych z wykorzystaniem komórek ssących. W mojej opinii zastosowane procedury badawcze były poprawne i pozwoliły Doktorantce na osiągnięcie zamierzonych celów.

Przedstawione w rozdziale 4 dysertacji wyniki badań wskazują, że możliwe było zweryfikowanie postawionych przez Panią mgr inż. Ewę Rybak hipotez badawczych. Dodatkowo Doktorantka opracowała model numerycznego procesu nanoprecypitacji, oparty na równaniach dyfuzji i koalescencji. Rozprawę zamyka dyskusja wyników i podsumowanie.

Pani mgr inż. Ewa Rybak umiejętnie wykorzystała dostępną literaturę przedmiotu, cytując łącznie 228 pozycje literaturowe. Dobór piśmiennictwa jest odpowiedni do analizy podjętego problemu badawczego. Ponad połowa (52%) cytowanych prac to publikacje wydane w ostatnim dziesięcioleciu. Świadczy to o tym, że Doktorantka rozumie wartość naukową swoich badań dla rozwoju inżynierii chemicznej, nanotechnologii i medycyny oraz śledzi najnowszą literaturę.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Ewy Rybak ma charakter interdyscyplinarny i łączy w sobie elementy inżynierii chemicznej, bioinżynierii i biomedycyny. Autorka wykazała się umiejętnością samodzielnego formułowania problemów badawczych i prowadzenia prac doświadczalnych. Pani mgr inż. Ewa Rybak w ramach swojej dysertacji rozwiązała oryginalny problem naukowy dotyczący optymalizacji procesu nanoprecypitacji i otrzymywania nanocząstek polimerowych o określonych właściwościach, które mogą zostać wykorzystane do transportu leków. Do największych osiągnięć Doktorantki zaliczam:

- określenie najkorzystniejszych parametrów procesu nanoprecypitacji (stężenia polimeru, rodzaju stosowanych rozpuszczalników i surfaktantów oraz temperatury itd.) do otrzymania nanocząstek polikaprolaktonowych (NP PCL) o pożądanym rozmiarach i przeznaczeniu;
- zaprojektowanie otrzymania hybrydowych nanocząstek polimerowych NP PCL o właściwościach magnetycznych z wykorzystaniem superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPIONów) oraz układu umożliwiającego ich separację;
- opracowanie modelu numerycznego procesu nanoprecypitacji, opartego na równaniach dyfuzji i koalescencji.

Podjęta przez mgr inż. Ewę Rybak problematyka jest ciekawa i ważna z perspektywy rozwoju nanonośników leków oraz obrazowania metodą magnetycznego rezonansu jądrowego. Wysunięte przez Doktorantkę hipotezy badawcze, sposób w jaki zaplanowała i przeprowadziła eksperymenty oraz dokonała analizy uzyskanych danych, predestynują Panią mgr inż. Ewę

Rybak do ubiegania się o stopień doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna.

3. Uwagi krytyczne i dyskusyjne

Obowiązkiem recenzenta jest również wykazanie słabych punktów rozprawy przedstawionej do oceny. Autorka nie ustrzegła się błędów edytorskich, językowych i gramatycznych. Poniżej przedstawiam wybrane przykłady:

- na wielu stronach pozostawiono wolne przestrzenie (np. str. 55, 63, 72, 79, 81 itd.);
- tytuły podrozdziałów, nie powinny być akronimami technik stosowanych do charakterystyki uzyskanych nanocząstek np. rozdział 4.9.1 – DLS, rozdział 4.9.2. – SEM, rozdział 4.9.3 – FTIR; tytuły wielu podrozdziałów w części metodycznej i części zawierającej wyniki są tożsame;
- brak skrótów stosowanych w tekście w zamieszczonym na początku rozprawy spisie np. RCF, SPION, PFA, L929, FBS, MG63, CAF, TME itd.
- stosowanie określeń „branżowych” np. str. 65 „pod komorą komórki przeniesiono z kriotuby do Falconu (...)” (najprawdopodobniej chodziło o próbówki wirówkowe typu Falcon);
- stosowanie nieprawidłowych form gramatycznych np. „obserwacje na mikroskopie konfokalnym”.

Większa część rozprawy Pani mgr inż. Ewy Rybak napisana jest zrozumiałym językiem z zachowaniem zasad właściwych dla opracowań naukowych. Jednak w części doświadczalnej Autorka używała bardzo dużo akronimów. Jako czytelnik często musiałam wracać do wcześniejszych rozdziałów lub korzystać z zamieszonego w rozprawie wykazu symboli. Ponadto świadomie lub nieświadomie Doktorantka zastosowała dużo skrótów myślowych. Skutkiem tego są niefortunne sformułowania np. na str. 75 Autorka pisze: „w kolejnym etapie badań skupiono się na wyborze par rozpuszczalników oraz doborze ich stosunku (...)”. Nie wiadomo czy chodziło o stan skupienia czy o grupę złożoną z dwóch dopełniających się elementów; nie jest też jasne czy chodzi o stosunek objętościowy, molowy czy masowy). Pomimo iż język tekstów naukowych powinien cechować się prostotą, czytając rozprawę miałam wrażenie, że Doktorantka pisała ją w pośpiechu i nie miała czasu zadbać o czytelnika. Mam również jedną uwagę dotyczącą struktury pracy. Część rozprawy zatytułowana wnioski zawiera treści, które powinny się znaleźć w rozdziale poświęconemu dyskusji wyników. Autorka cytuje w nim literaturę i porównuje własne wyniki z rezultatami uzyskanymi przez inne zespoły badawcze. Wnioski, jak sama nazwa mówi powinny wynikać bezpośrednio z własnych danych badawczych. W pracy naukowej stanowią one jasno sformułowaną odpowiedź na postawione cele. Oczekiwałam, że w tym rozdziale Doktorantka jasno określi, która metoda syntezy nanocząstek polimerowych przyniosła najlepsze rezultaty i które NP charakteryzowały się najkorzystniejszymi właściwościami do zastosowań jako potencjalne nośniki leków.

Doktorantka przeprowadziła analizę statystyczną uzyskanych danych z zastosowaniem testu post hoc Tukeya, który wymaga wykonania jednoczynnikowej analizy ANOVA. Niestety w rozprawie brakuje tabel prezentujących wykonane obliczenia. Ponadto zarówno w tabelach, jak i w opisach rysunków nie jest wytłumaczone co oznacza SD (błąd standardowy), poziom istotności p lub symbol *. Nie jest również wiadome czym jest $n = 6$ w opisie rysunku 42 i 43.

Oczywiście te uwagi nie wpływają na ogólną ocenę uzyskanych przez Panią mgr inż. Ewę Rybak rezultatów, a wskazane przeze mnie błędy z pewnością zostaną usunięte podczas przygotowania kolejnych publikacji.

Podczas publicznej obrony, prosiłabym Panią mgr inż. Ewę Rybak o przedyskutowanie następujących kwestii. W rozdziale 1.3.1. zatytułowanym „Enkapsulacja substancji hydrofobowych” pisze Pani o wyjątkowych właściwościach optycznych fluoresceiny, która czyni ją idealnym związkiem modelowym do oceny efektywności enkapsulacji w nanocząsteczkach. Czy mogłaby Pani przybliżyć o jakie właściwości chodziło oraz podać co było motywacją do wyboru właśnie tego barwnika. Moją ciekawość budzą również ograniczenia (np. masa molowa, rozpuszczalność itp.) jakie mogą się pojawić gdy w uzyskanych przez Panią nanocząstkach będzie enkapsulowana substancja terapeutyczna. Ponadto chciałabym się dowiedzieć co rozumie Pani przez skumulowane uwalnianie barwnika i w jaki sposób je Pani określała (rysunek 40, str. 97)? Z analizy rysunku 41 wynika, że wydajność enkapsulacji fluoresceiny (EE%) w nanocząstkach 1% polikaprolaktonu (PCL) nie różniła się istotnie gdy porównujemy metody syntezy tj. dozowanie kroplami (DNP) oraz w układzie mikroprzepływowym (MNP). Duża różnica pomiędzy obiema metodami widoczna jest natomiast dla procentu załadowania barwnika do nanocząstek (DL%). Czy można to wytłumaczyć? Jeśli tak, to prosiłabym o Pani interpretację.

Chciałabym się również dowiedzieć czym kierowała się Pani wybierając kwas oleinowy do pokrycia supermagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPIONów).

W podsumowaniu zabrakło mi odniesienia do potencjalnego zastosowania otrzymanych nanocząstek polimerowych jako nośników leków. Uzyskane przez Panią wyniki badań prowadzonych na liniach komórkowych fibroblastów mysich L929 i ludzkich komórek kostniakomięsaka MG63 świadczą o tym, że zsyntetyzowane metodą nanoprecypitacji NP z równą skutecznością docierają do komórek nowotworowych, jak i zdrowych (L929). Czy uzyskane przez Panią nanocząstki polimerowe mają szansę zostać wykorzystane w teranostyce czy raczej w terapiach celowanych?

4. Ocena pozostałego dorobku

Cały dorobek naukowy Pani mgr inż. Ewy Rybak w oparciu o przedstawiony przez Doktorantkę spis publikacji obejmuje 3 prace z listy JCR. Łączne wskaźniki dla tych artykułów to: IF = 16,4 i 340 punktów MEiN (Komunikat Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z późn. zm.). Pozostały dorobek Doktorantki obejmuje 3 rozdziały w monografiach i 2 wystąpienia konferencyjne. Doktoranta nie podała czy jest współautorką zgłoszeń patentowych lub patentów z zakresu rozprawy doktorskiej. Pani mgr inż. Ewa Rybak otrzymała grant dziekański na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej (2019/2020) i była wykonawcą w 3 projektach badawczych NCBR.

5. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Ewy Rybak pt. „Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą nanoprecypitacji, ocena ich właściwości do zastosowania jako potencjalnych nośników leków” spełnia wszystkie kryteria zwyczajowe i formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. PoSWiN i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna

Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego i publicznej obrony.

Agneta Markowska-Smyka