



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA  
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
**KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW**  
Prof. dr hab. inż. Elżbieta PAMUŁA

Kraków, 10 marca 2025

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Rybak  
pt. "Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą  
nanoprecypitacji, ocena ich właściwości do zastosowania jako  
potencjalne nośniki leków"  
zrealizowanej pod kierunkiem  
Promotora prof. dr. hab. inż. Tomasza Ciacha  
i Promotora pomocniczego dr. Jakuba Trzcíńskiego

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały Rady Naukowej  
Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej  
z dnia 17 grudnia 2024  
oraz zlecenia Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny  
Inżynieria Chemiczna Prof. dr. hab. inż. Tomasza Sosnowskiego  
z dnia 19 grudnia 2024

Rozwój nanotechnologii przyczynił się do opracowania w ostatnich latach szeregu nowych rozwiązań dla medycyny opartych na nanomateriałach. Zaliczyć można do nich np. liposomowe nośniki leków, szczepionki mRNA w postaci nanocząstek lipidowych, które doskonale sprawdziły się w czasie ostatniej pandemii SARS-Cov2 a ponadto bionanosensory, czy preparaty do obrazowania medycznego. Duże nadzieje pokłada się w degradowalnych nanocząstkach polimerowych, które mogą być zastosowane w teranostyce, a więc jednocześnie spełniać funkcję ułatwiającą diagnostykę i obrazowanie oraz dostarczać leki w pożądane miejsce w organizmie człowieka.



Wimic

Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
Katedra Biomateriałów i Kompozytów  
al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, tel. +48 12 617 44 48, fax. +48 12 617 33 71  
e-mail: epamula@agh.edu.pl, www.ceramika.agh.edu.pl  
Regon: 000001577, NIP: 675 000 19 23

Badania pani mgr inż. Ewy Rybak prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej doskonale wpisują się w powyższy trend. Uważam więc, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej jest trafny, aktualny i dobrze uzasadniony. Tytuł rozprawy *"Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą nanoprecypitacji, ocena ich właściwości do zastosowania jako potencjalne nośniki leków"* został właściwie sformułowany i wskazuje, że praca dobrze wpisuje się w dyscyplinę inżynieria chemiczna.

Praca doktorska mgr inż. Ewy Rybak została zredagowana w języku polskim i liczy 152 strony. Na początku doktorantka zamieściła streszczenie w językach polskim i angielskim, listę swoich publikacji, wystąpień konferencyjnych i projektów, w których uczestniczyła, a także dane dotyczące przyznanych jej nagród i sprawowanej opieki nad studentami. Praca zawiera rozdział 1. Wprowadzenie (31 stron), rozdział 2. Cel i założenia pracy (1 strona), rozdział 3. Materiały i metody (17 stron), rozdział 4. Wyniki (33 strony) i rozdział 5. Wnioski (4 strony). Dalej pojawia się jednak rozdział 6. Model, w którym wyróżniono 6 podrozdziałów (11 stron) i rozdział 7. Podsumowanie (2 strony). Doktorantka zamieściła ponadto w pracy spis używanych materiałów i sprzętów a także spis tabel i rysunków. Pracę kończy bibliografia zawierająca aż 228 pozycji. Rozprawę cechuje właściwa proporcja pomiędzy częścią literaturową a doświadczalną, a literatura jest prawidłowo dobrana. Praca spełnia też wymagania ustawowe i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim.

W rozdziale 1. doktorantka dużo miejsca poświęciła metodzie nanoprecypitacji, skrupulatnie opisując jej mechanizm i warunki mające wpływ na proces otrzymywania nanocząstek, takie jak mieszczanie, temperatura i parametry procesowe takie jak natężenie przepływu fazy wodnej i olejowej oraz stosunek objętościowy obu faz. Dalej skupiła się na technikach mikroprzepływowych, oraz kryteriach wyboru polimerów, rozpuszczalników i surfaktantów. W dalszej części tego rozdziału opisała podstawy metody wyznaczania wielkości nanocząstek za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS),

oceny ich budowy za pomocą technik mikroskopowych i badań biologicznych w kontakcie z komórkami ssaczymi *in vitro*. Uwzględnione też zostały zagadnienia dotyczące enkapsulacji substancji hydrofobowych w nanocząstkach polimerowych, przedstawiony został mechanizm ich uwalniania a także potencjalne wykorzystanie nanocząstek superparamagnetycznych w nanomedycynie. Zagadnienia omówione w rozdziale 1. Wprowadzenie są w pełni uzasadnione tematyką rozprawy. Doktorantka nie ustrzegła się jednak szeregu błędów stylistycznych, np. pierwsze zdanie na str. 21 jest zupełnie niezrozumiałe. Podobnie na str. 23 Doktorantka pisze o „*substancji rozpuszczonej, która jest transportowana z płynu masowego przez warstwę graniczną roztworu przylegającą do powierzchni zarodków*”. Na str. 32 jest napisane, że „*chemię polimerów można wykorzystać do poprawy ich jasności*”. Bardzo proszę spróbować powyższe zdania przeredagować i odnieść się do moich uwag albo w pisemnej formie przed obroną albo w czasie publicznej obrony. Co autorka rozumie pisząc na str. 33 „*o wysokiej przepuszczalności PCL dla leków*”? Doszło też moim zdaniem do niefortunnego przetłumaczenia tekstu z języka angielskiego, gdyż na tej samej stronie zostało napisane, że „*fragmenty PCL są obserwowane w fagosomach makrofagów oraz komórek olbrzymich w fibroblastach*”. Tak sformułowane zdanie oznacza to, że w fibroblastach znajdują się komórki olbrzymie, co jest twierdzeniem fałszywym, bo komórki olbrzymie powstają z fuzji makrofagów, nieraz nawet kilkudziesięciu, bądź nawet kilkuset, mają wielkość wielokrotnie większą niż pojedyncze fibroblasty, stąd nie mogą „*być w fibroblastach*”. Co doktorantka miała na myśli pisząc na str. 39: „*Metodę nanoprecypitacji można uznać za mało inwazyjną*”, proszę o wyjaśnienie. Sugerowałabym też użycie nieco innych symboli we wzorze na efektywność enkapsulacji: zamiast „*m<sub>cała</sub>*” w kontekście masy całkowitej lepiej brzmiałoby „*m<sub>całkowita</sub>*” lub „*m<sub>c</sub>*”. Doktorantka używa też niewłaściwej nomenklatury dla polimerów: zamiast „*alkohol poliwinylowy*” (str. 27, str. 37) powinno być „*poli(alkohol winylowy)*”.

W dalszej części rozprawy sformułowano cele i założenia pracy, do których nie mam zastrzeżeń.

Cześć eksperymentalna prezentuje materiały i metody z wystarczającą dokładnością, aby możliwe było powtórzenie opisanych eksperymentów, co uważam za właściwe. Nie zrozumiałam co oznacza wyrażenie „żarnik acetonitryl-butadien-styren (ABS)”, w kontekście druku 3D – proszę o wyjaśnienie. Zastanawia mnie też zastosowana metoda sterylizacji zawiesiny nanocząstek PCL za pomocą promieniowania UV: czy czas aż 3 godzin ekspozycji nie był na tyle długi, że mógłby spowodować utlenienie powierzchni nanocząstek albo wpłynąć na ich degradację? Dlaczego zastosowano aż tak długi czas sterylizacji?

W rozdziale 4. Wyniki Doktorantka opisała rezultaty badań nad optymalizacją procesu wytwarzania nanocząstek PLGA i PCL metodą mikroprzepływową, tak dobierając parametr R wzajemnego przepływu faz, aby uzyskać nanocząstki o jak najmniejszej średnicy i współczynniku polidispersji. Następnie dla ustalonego w poprzednim podrozdziale przepływu fazy wodnej dobrano stosunek wzajemny różnych rozpuszczalników i wykazano, że mieszanina DCM i DMSO w stosunku 1:20 jest najkorzystniejsza, a następnie wyselekcjonowano 0.5% dodatek surfaktantu Pluronic F127, jako najkorzystniejszy w badanym układzie. Badania wykazały, że spośród analizowanych metod wytwarzania, tj. jednorazowego wstrzyknięcia fazy olejowej od fazy wodnej, dozowania jej kroplami i użycia metody mikroprzepływowej, to ta ostatnia metoda, okazała się najlepsza, bo pozwala na otrzymanie najmniejszych i najbardziej jednorodnych nanocząstek przy wszystkich badanych stężeniach polimeru w fazie olejowej. W dalszej części badano sposób odparowania rozpuszczalnika i wykazano, że zastosowanie wyparki obrotowej zapobiega wzrostowi średnicy cząstek i ich polidispersji. Doktorantka przeprowadziła również systematyczne badania nad oczyszczaniem otrzymanych cząstek dowodząc, że dodatek współrozpuszczalnika oraz NaOH poprawia kształt i morfologię nanocząstek. Rozmiarem nanocząstek i rozkładem ich wielkości można też w pewnym

zakresie sterować poprzez obniżenie temperatury układu. Doktorantka badała wpływ temperatury (20, 40, 60 i 80 °C), ale tu nasuwa mi się pytanie czy obniżenie temperatury i prowadzenie badań „na lodzie” byłoby możliwe w danym przypadku i czy mogłoby pozwolić na uzyskanie lepszych wyników? Kolejny analizowany przez Autorkę parametr procesowy dotyczył stabilności zawiesin nanocząstek po liofilizacji i roli krioprotektanta w postaci trechalozy. W kolejnych rozdziałach doktorantka opisała wyniki badań nad enkapsulacją fluoresceiny w opracowanych nanocząstkach i jej uwalnianiem w układzie PBS:DMSO (4:1). Tu nasuwa mi się pytanie, czy taki układ jest dobrym modelem do naśladowania środowiska biologicznego? Badania *in vitro* nie wykazały cytotoksyczności cząstek przy stężeniu 10 mg/ml względem komórek fibroblastycznych L929 i osteoblastopodobnych MG63, co jest wynikiem korzystnym. W dalszej części rozdziału 4. doktorantka przedstawiła wyniki dotyczące superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza i zamykania ich w nanocząstkach PCL. Chociaż wyniki enkapsulacji nie wydają się być spektakularne z uwagi na niski współczynnik enkapsulacji, to badania te należy uznać za obiecujące. Czy zdaniem doktorantki można byłoby poprawić współczynnik enkapsulacji dokonując modyfikacji powierzchni nanocząstek magnetycznych? Gdzie można byłoby zastosować takie nanocząstki PCL załadowane nanocząstkami magnetycznymi?

W rozdziale 5. Doktorantka poddała dyskusji uzyskane wyniki i zestawiła najważniejsze wnioski z dotychczasowych badań, odnosząc się do właściwej literatury przedmiotu. Wskazuje to, że potrafi ona spojrzeć na uzyskane wyniki w sposób syntetyczny. Za najważniejsze osiągnięcie recenzowanej pracy uważam dobór odpowiednich parametrów procesowych w metodzie nanoprecypitacji, w rezultacie czego proces wytwarzania nanocząstek PCL stał się bardziej efektywny a nanocząstki bardziej jednorodne pod względem wielkości. Doktorantka wiele miejsca poświęciła wyjaśnieniu dlaczego mikroskopia elektronowa nie nadaje się do wizualizacji uzyskanych cząstek i tłumaczyła dlaczego uzyskane obrazy nie są dobrej jakości.

Oczywiście doceniam wywody doktorantki, ale czy w przypadku nanocząstek z polimeru o niskiej odporności termicznej, jakim jest PCL, nie należało wykorzystać innej metody obrazowania, np. mikroskopii sił atomowych?

Rozdział 6 dotyczył stworzenia modelu, który przewidywałby jak warunki procesu współstrącania wpływają na wielkość cząstek. Analizowano wpływ etanolu jako współrozpuszczalnika, stężenie PCL oraz dodatek surfaktantu. Generalnie, uzyskane wyniki numeryczne były zgodne z wynikami eksperymentalnymi, co należy uznać za kolejne osiągnięcie tej pracy.

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że dysertacja doktorska mgr inż. Ewy Rybak pt. *"Otrzymywanie nanocząstek polimerowych metodą nanoprecypitacji, ocena ich właściwości do zastosowania jako potencjalne nośniki leków"* spełnia kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn.zm.). Na wymienione niedociągnięcia i niejasności zwróciłam uwagę z racji pełnienia funkcji recenzentki, aby doktorantka w przyszłości nieco więcej uwagi poświęcała stronie redakcyjnej swoich kolejnych opracowań. Uwagi te nie umniejszają jednak mojej wysokiej oceny merytorycznej recenzowanej pracy. Pozostałe uwagi i pytania są zaproszeniem do dyskusji naukowej w trakcie publicznej obrony. Dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie pani mgr inż. Ewy Rybak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

