

Dr hab. inż. Hanna Kierzkowska-Pawlak, prof. PŁ
Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska
Politechnika Łódzka

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Ilony Łojszczyk

pt. „Otrzymywanie mikrocząstek polimerowych do zastosowań medycznych”

Promotor: prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach

Promotor pomocniczy: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Wprowadzenie

Rozwój procesów wytwarzania mikrocząstek polimerowych i ich nowe, niezwykle obiecujące obszary zastosowań w medycynie, np. w leczeniu nowotworów techniką embolizacji, projektowaniu implantów kostnych czy systemów kontrolowanego uwalniania leków, wymaga interdyscyplinarnych badań z zakresu inżynierii chemicznej, materiałowej oraz nauk medycznych. Konieczność biogodności i braku skutków ubocznych u pacjentów w odniesieniu do użytego materiału oraz wymóg wąskiego rozkładu średnic mikrocząstek ma wpływ na rosnące oczekiwania w stosunku do składników stosowanych do ich produkcji, jak i samych technik wytwarzania. Mimo licznych przykładów technik produkcji zaawansowanych materiałów polimerowych odpowiednich do określonej aplikacji, temat nadal jest otwarty. Świadczy o tym m. in rosnący trend w ciągu ostatnich 5 lat liczby publikacji według kryterium wyszukiwania słów: mikrocząstki i polimery w tytule, abstrakcie i słowach kluczowych (baza Scopus). Duża część tych pozycji literaturowych dotyczy badań z zakresu nauk technicznych, przede wszystkim inżynierii chemicznej, których celem jest opracowanie procesu otrzymywania mikrocząstek o średnicy i właściwościach dopasowanych do konkretnej aplikacji. Wśród wad licznych rozwiązań proponowanych w literaturze można wymienić trudności w sterowaniu rozmiarami i morfologią uzyskiwanych mikrocząstek oraz problemy operacyjne wynikające ze stopnia skomplikowania aparatury.

W świetle aktualnych doniesień literaturowych i zgłoszeń patentowych, opracowanie uniwersalnej techniki otrzymywania mikrocząstek o zadanych właściwościach jest zadaniem aktualnym i ambitnym. Autorka rozprawy doktorskiej proponuje wykorzystanie do tego celu modułu membranowego własnej konstrukcji. Uważam, że podjęcie pracochłonnych badań dotyczących opracowania praktycznego, nieskomplikowanego rozwiązania konstrukcyjnego aparatury do wytwarzania mikrocząstek jest w pełni uzasadnione i ma duży potencjał aplikacyjny w zastosowaniach medycznych.

Ocena rozprawy

Od strony formalnej praca doktorska została przygotowana z typowym podziałem na dwie zasadnicze części: literaturową i eksperymentalną, które zostały poprzedzone *Wstępem* i rozdziałem zawierającym *Cel i zakres pracy*. Opracowanie obejmuje 197 stron. Całość otwiera zwięzłe 1-stronicowe streszczenie oraz kończy lista 257 pozycji literaturowych, 11 załączników zawierających szczegółowe dane pomiarowe i wykaz dorobku naukowego Autorki rozprawy wraz z informacją o źródłach finansowania badań.

W rozdziale 2. *Cel i zakres pracy* Autorka zdefiniowała problem badawczy i zaproponowała metodę jego rozwiązania przez opracowanie konstrukcji modułu membranowego umożliwiającego otrzymanie biozgodnych mikrocząstek o zadanym rozkładzie średnic z roztworów polimerów o różnym składzie. Teza naukowa rozprawy doktorskiej zakłada, że „emulgowanie membranowe z wykorzystaniem autorskiego modułu membranowego jest efektywną metodą wytwarzania biozgodnych mikrocząstek polimerowych o złożonej strukturze wewnętrznej i złożonej budowie warstwy zewnętrznej. Ponadto skład roztworu nierozpuszczalnika w połączeniu z szybkością mieszania ma wpływ na rozkład średnic wytwarzanych mikrocząstek, natomiast skład roztworu polimeru znacząco wpływa na porowatość cząstek. W konsekwencji, otrzymane struktury o danej charakterystyce mogą znaleźć różne zastosowania w medycynie. Doktorantka określiła cele i zakres planowanych badań obejmujących wytworzenie mikrocząstek litych i porowatych z poli(kwasu mlekowego) (PLA). Zaplanowała wykorzystanie narzędzi inżynierii chemicznej do oceny wpływu warunków prowadzenia procesu emulgowania na określone właściwości produktu.

W części literaturowej stanowiącej rozdział 3. *Mikrocząstki*, Autorka dokonuje klasyfikacji mikrocząstek oraz opisuje konwencjonalne i nowe techniki ich otrzymywania. W mojej ocenie, w opisie aktualnego stanu wiedzy brakuje krytycznej analizy dotyczącej oceny wpływu parametrów operacyjnych procesu emulgowania membranowego na wielkość i właściwości wytwarzanych mikrocząstek. Uważam również, że pogłębiona analiza dotycząca ograniczeń istniejących rozwiązań procesowych opisywanych w literaturze lub zgłoszeniach patentowych byłaby wartościowa w kontekście celowości podjętych przez Autorkę badań. Mimo że Autorka powołuje się przeważnie na aktualne doniesienia literaturowe, w recenzowanej rozprawie brak jest syntetycznego podsumowania i uzasadnienia, że zarówno w technice emulgowania membranowego, jak i innych metodach wytwarzania mikrocząstek, problemy związane z przewidywaniem właściwości produktu nie zostały do tej pory rozwiązane.

Rozdział 3.3 dotyczący kierunków zastosowań mikrocząstek w leczeniu chorób nowotworowych oraz jako nośników leków i innych substancji, to najobszerniejsza część przeglądu literatury. W mojej opinii, przedstawienie zastosowań w leczeniu nowotworów jest zbyt szczegółowe i mogłoby przyjąć bardziej syntetyczną formę. Autorka skupia się bowiem w pracy na procesie wytwarzania mikrocząstek, a nie na ocenie ich skuteczności w praktycznych zastosowaniach medycznych. Podsumowując, przegląd aktualnego stanu wiedzy jest w większości poprawny i szeroki biorąc pod uwagę liczbę cytowanych źródeł, natomiast opis zastosowań mikrocząstek w leczeniu nowotworów nie ma ścisłego związku z badaniami własnymi Autorki.

Część eksperymentalną rozpoczyna opis zaprojektowanego układu do wytwarzania mikrocząstek, procedur ich wytwarzania i modyfikacji, metodyki prowadzenia badań oraz stosowanych metod eksperymentalnych. Warto podkreślić, że zaprojektowany i skonstruowany oryginalny moduł membranowy stał się podstawą do zgłoszenia patentowego. W badaniach wykorzystano hydrofilową teflonową membranę o średnicy porów 10,0 μm . W pracy Autorka skupiła się na wytworzeniu i charakterystyce wielu rodzajów mikrocząstek na bazie PLA w roztworze dichlorometanu jako rozpuszczalnika. Testowała osiem niejonowych emulgatorów tworzących emulsje typu O/W lub W/O jako dodatków do roztworu nierozpuszczalnika. Ze względu na potencjalne zastosowanie mikrocząstek w leczeniu guzów nowotworowych, badała wpływ dodatku węgla bizmutu jako środka cieniującego, a dla mikrocząstek o zastosowaniu jako systemów uwalniania substancji – wpływ dodatku porogenów i aldehydu laurynowego na właściwości otrzymanego produktu.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie oryginalnej techniki emulgowania membranowego oraz zbadanie wybranych właściwości wytworzonych mikrocząstek polimerowych pod kątem potencjalnych zastosowań medycznych. Zakres pracy stanowiły cztery zadania

badawcze związane z opracowaniem warunków syntezy (1) litych mikrocząstek, (2) mikrocząstek z dodatkiem środka cieniującego, (3) porowatych mikrocząstek, (4) litych i porowatych mikrocząstek w zastosowaniach jako nośniki substancji. Wyniki prezentowane są w postaci histogramów rozkładów średnic, wykresów pudełkowych rozkładów średnic oraz zdjęć SEM otrzymanych struktur. Głównym kryterium oceny jakości produktu był największy rozkład średnic mikrocząstek. Dla mikrocząstek polimerowych w zastosowaniach jako nośniki leków i białek oceniano również warunki uwalniania substancji.

W przypadku litych mikrocząstek polimerowych, badania wykonano dla dwóch stężeń roztworu PLA zmieniając stężenie emulgatorów w roztworze nierozpuszczalnika pod kątem doboru właściwej wartości parametru HLB, który określa powinowactwo emulgatora do fazy O i W. Autorka wykazała, że zaprojektowany moduł membranowy, przy zastosowaniu odpowiedniego składu roztworu emulgatorów (określonego przez wartość parametru HLB) oraz dodatku kwasu linolowego, zapewnia wytworzenie cząstek o wymaganym wąskim rozkładzie średnic przy małych stratach i braku aglomeracji cząstek. Przedstawione w tej części pracy wyniki potwierdziły zatem praktyczne zastosowanie opracowanego rozwiązania konstrukcyjnego.

Pewna niejasność występuje w interpretacji wyników (rozdział 4.4.4), gdzie Autorka wskazuje na brak wpływu masy cząsteczkowej polimerów na przebieg procesu, a dokładnie na średnicę cząstek. Ponieważ dokładna masa cząsteczkowa polimerów nie była znana, w oznaczeniach stosowanych polimerów PLA10, PLA18, PLA38, PLA90 przyjęto wskaźniki liczbowe proporcjonalne do masy cząsteczkowej odczynników. Wniosek, że „analiza właściwości reologicznych roztworów polimerów (Wykres 5.9.) nie wykazała istotnych różnic w lepkości PLA o różnej masie cząsteczkowej – choć wzrost masy cząsteczkowej polimeru skutkował wzrostem wartości lepkości” został sformułowany bardzo nieprecyzyjnie. Z wykresu 5.9 wyraźnie wynika, że lepkość roztworów PLA rośnie ze wzrostem masy cząsteczkowej polimeru w badanym zakresie szybkości ścinania. Szkoda, że Autorka nie podjęła próby skorelowania lepkości roztworu polimeru z logarytmiczną liczbą lepkościową, żeby porównać swoje dane z literaturą. W tej części pracy, dyskusja dotycząca właściwości reologicznych roztworów polimerów o różnej masie cząsteczkowej nie jest w pełni zrozumiała; opis osi na Wykresie 5.8 zaczerpniętym z literatury wymaga wyjaśnienia („IV (dl/g) w chloroformie”) a podana jednostka na osi poziomej nie zgadza się z komentarzem tekście.

Następny niuans o braku zależności między masą cząsteczkową PLA a średnicą cząstek polimerowych został wysnuty bez analizy statystycznej danych. W omawianej części pracy brakuje również kontekstu literaturowego w odniesieniu do badań innych autorów w tym zakresie.

Moje wątpliwości dotyczą też składu roztworów podanych w tabelach, np. Tab. 4.2, 4.15 oraz opisu wyników badań (rozdział 5) – często podawany jest ogólny skrót polimeru - PLA. Ponieważ badane były polimery o różnej masie cząsteczkowej, nie jest jasne, którego polimeru dotyczy stosowane oznaczenie PLA? Poproszę o wyjaśnienie.

W następnym etapie, Autorka wytworzyła mikrocząstki polimerowe z dodatkiem węgla bizmutu, aby umożliwić wizualizację i śledzenie mikrocząstek PLA z zastosowaniem obrazowania rentgenowskiego. Za pomocą mikroskopii SEM i fluorescencji rentgenowskiej XRF potwierdziła obecność bizmutu w strukturze cząstek, potwierdzając skuteczność opracowanej metody syntezy.

Prowadząc dalsze badania w zakresie modyfikacji składu roztworu nierozpuszczalnika, Autorka wykazała, że zastosowanie heksanu o stężeniu 10% mas. jako porogenu pozwala na wytworzenie najkorzystniejszego wariantu porowatych mikrocząstek, gdzie głównym kryterium oceny była liczebność i rozmiar uzyskanych struktur oraz porowatość.

W celu realizacji ambitnego celu praktycznego pracy, wskazującego na możliwość zastosowań wytworzonych mikrocząstek litych i porowatych jako skutecznych systemów

uwalniania substancji, Autorka zaplanowała dalszą część badań związanych z doświadczalną oceną uwalniania z zastosowaniem modelowych substancji: 9-aminoakrydyniny oraz enzymu ALP. Wykazała, zgodnie z oczekiwaniem, że cząstki porowate szybciej uwalniają barwnik 9-aminoakrydynę niż cząstki lite. Wytworzyła mikrocząstki o odpowiednio dobranym składzie i średnicy, które stanowiły efektywny nośnik białka o przedłużonym. Badania mgr inż. Ilony Łojarczyk wykazały, że struktura mikrocząstek zamkniętych w matrycy hydrożelowej PVP24, pozwala na wydzielanie substancji do tej matrycy, i po jej powolnej degradacji, na przedłużenie działania uwolnionego leku. W celu dalszego spowalniania procesu uwalniania leku i przedłużenia jego działania, zmodyfikowała strukturę mikrocząstek porowatych przez dodatek aldehydu laurowego, który posłużył w kolejnym etapie do przyłączenia białka poprzez zasadę Schiffa. Wykazała wpływ dodatku aldehydu na znaczące zmniejszenie rozmiarów uzyskiwanych struktur i na wzrost porowatości.

Autorka przeprowadziła cały szereg testów cytotoksycznych materiałów na bazie PLA, potwierdzając biogodność otrzymanych mikrocząstek.

Po analizie części eksperymentalnej rozprawy, oprócz wymienionych wcześniej uwag nasuwają się następujące pytania:

1. Czy szybkość odparowania rozpuszczalnika może mieć wpływ na morfologię mikrocząstek?
2. Czy przetestowano inne rodzaje membran (inna wielkość porów, inna zwilżalność) skoro konstrukcja modułu pozwala na elastyczność w tym przypadku.
3. Dlaczego przy produkcji cząstek litych, główną zmienną procesową był skład roztworu nierozpuszczalnika a nie sterowano szybkością mieszania, skoro zgodnie z literaturą łatwo przewidzieć ten wpływ?
4. Jaki jest potencjał powiększenia skali zaproponowanej metody wytwarzania mikrocząstek?

Podsumowując ocenę rozprawy, jej mocną stroną jest niewątpliwy element nowości – opracowanie procesu wytwarzania biogodnych mikrocząstek do różnych zastosowań medycznych z wykorzystaniem oryginalnego modułu membranowego, który jest przedmiotem zgłoszenia patentowego. Zaletą pracy jest ogromny materiał doświadczalny, potwierdzający skuteczność zaproponowanego rozwiązania konstrukcyjnego modułu do wytwarzania mikrocząstek. Teza pracy została udowodniona.

Badania wykonane przez Doktorantkę wymagały znacznego nakładu pracy i charakteryzują się dużą systematycznością pozwalającą na wytworzenie kilku rodzajów mikrocząstek pod kątem określonych aplikacji medycznych. Zastosowano różne techniki obrazowania mikrocząstek: skaningową mikroskopię elektronową, mikroskopię konfokalną i fluorescencyjną. W badaniach wykorzystano również dopplerowską elektroforezę laserową, reometrię ścinającą, spektroskopię UV-VIS, rentgenowską analizę fluorescencyjną. Analizy cytotoksyczności wymagały znajomości licznych metod biologicznych. Zastosowana duża różnorodność metod badawczych świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu laboratoryjnym Doktorantki do prowadzenia prac w obszarze projektowania zaawansowanych materiałów polimerowych do zastosowań medycznych.

Autorka przedstawia wyniki w sposób uporządkowany: opisuje procedurę wytwarzania mikrocząstek do zastosowań medycznych dla różnych wariantów syntezy, a następnie omawia wyniki. Po zakończeniu każdego rozdziału nie ma jednak podsumowania i wniosków. W całej pracy nie podjęto próby znalezienia empirycznej zależności między parametrami procesu emulgowania membranowego a jakością produktu. Doktorantka nie zgłębia mechanizmów badanych procesów a omówienie wyników ma charakter stwierdzenia faktów. Oceniając jakość mikrocząstek pod kątem konkretnych zastosowań, Autorka porównuje ze sobą wyniki różnych eksperymentów, posługując się numerem wariantu. Taki sposób porównania wymaga od czytelnika

analizy wcześniejszych rozdziałów i samodzielnej oceny wpływu warunków procesu emulgowania, określonych przede wszystkim przez skład roztworu polimeru lub skład roztworu nierozpuszczalna, na jakość produktu. Proponowana analiza wpływu parametrów operacyjnych na właściwości mikrocząstek jest szczególnie ważna ze względu na wskazanie inżynierii chemicznej jako dyscypliny, w której realizowana jest rozprawa doktorska. Brak tej analizy zmniejsza praktyczne znaczenie przedstawionych wyników badań i w pewnym stopniu ogranicza ich wartość naukową.

Praca napisana jest dość przejrzysto, chociaż Autorka nie uniknęła błędów korektorskich, przejęczyzeń czy nieprecyzyjności. Mam wrażenie, że Doktorantka zakłada, że czytelnik wie wszystko, co ma na myśli autor, nie wyjaśniając pewnych zależności, nie podając znaczenia poszczególnych symboli w sytuacji, gdy pojawiają się one po raz pierwszy w tekście. Przykładowe niedociągnięcia przedstawiono poniżej:

1. Rys. 3.9 brak legendy do użytych oznaczeń, co uniemożliwia zrozumienie opisu w tekście
2. W całej pracy - brak odmiany słowa Rysunek
3. Str. 31 - niezręczności językowe: „Źródła o wysokiej energii, takie jak ultradźwięki, homogenizator lub mielenie”
4. Str. 38 – powinno być cząstki zamiast cząsteczki
5. Stosowane skróty, jak np. THF, CHP (str. 81), cewnik TAE, AA (str. 82) powinny być po raz pierwszy wyjaśnione w tekście bez konieczności odwołania się do wykazu skrótów i oznaczeń
6. Str. 66. –jest „z prędkością 60 ml/godz” – powinno być z natężeniem przepływu
7. W całej pracy podpis pod tabelami „Całkowita objętość mieszaniny emulgatorów w roztworze wynosi 0,1%,- chodzi o ułamek objętościowy, nie objętość
8. Str. 76 – powinno być wydzielają zamiast „wydziały”
9. Str. 82 – powinno być: granica faz zamiast interfejs

Pragnę dodać, że powyższe uwagi nie wpływają na ogólną, pozytywną ocenę całości rozprawy doktorskiej.

Wnioski końcowe

Przedstawiona przez mgr inż. Ilony Łojszczyk rozprawa pt. „Otrzymywanie mikrocząstek polimerowych do zastosowań medycznych” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, zaś Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i wykonywania badań oraz logicznego przedstawiania wyników. Pani mgr inż. Ilony Łojszczyk zrealizowała założony cel jakim było opracowanie procesu wytwarzania biozgodnych mikrocząstek do różnych zastosowań medycznych z wykorzystaniem oryginalnego modułu membranowego, który jest przedmiotem zgłoszenia patentowego. Doktorantka posiada dobry dorobek naukowy potwierdzony publikacjami o wysokim współczynniku wpływu. Stwarza to podstawę do stwierdzenia, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera wartościowe elementy o charakterze poznawczym oraz praktycznym.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa Pani mgr inż. Ilony Łojszczyk odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim i przedstawiam wniosek o dopuszczenie jej do publicznej obrony.

