



Zachodniopomorski
Uniwersytet
Technologiczny
w Szczecinie



Katedra
Inżynierii Polimerów
i Biomateriałów

Al. Piastów 45, 71-311 Szczecin

prof. dr hab. inż. Mirosława El Fray

tel: (+48) 91 499 48 28
fax: (+48) 91 499 40 98
Email: mirfray@zut.edu.pl

Ocena pracy doktorskiej Pani mgr inż. Ilony Łojszczyk

pt.: „Otrzymywanie mikrocząstek polimerowych do zastosowań medycznych”

przedstawionej do obrony na Wydziale Inżynierii Chemicznej
i Procesowej
Politechniki Warszawskiej
Promotor: prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach
Promotor pomocniczy: dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 197 stron maszynopisu, w tym 11 załączników z tabelami i wykresami, które stanowią uzupełnienie bogatej dokumentacji eksperymentalnej zawartej w zasadniczej części rozprawy. Oprócz spisu treści, Doktorantka zamieściła w pracy również spis symboli i skrótów. W pracy zacytowano 257 pozycji literaturowych. Praca podzielona jest na 8 rozdziałów uzupełnionych o informację o dorobku naukowym Doktorantki.

Ocenę merytoryczną i naukową pracy pragnę przedstawić w następujących punktach.

1. Aktualność tematu
2. Elementy nowości w pracy
3. Analiza doboru technik eksperymentalnych i metodyk badawczych
4. Uwagi dyskusyjne
5. Wnioski końcowe

Aktualność tematu pracy

Wytwarzanie polimerowych obiektów o rozmiarach mikrometrycznych i ich stosowanie w medycynie stanowi ważny kierunek w terapiach wymagających precyzyjnego dostarczenia i uwalniania leków o określonych właściwościach i w miejscach zmienionych chorobowo, w tym nowotworowych. Wykorzystanie mikrocząstek jako obiektów o zdefiniowanych rozmiarach może stanowić również fizyczną barierę na drodze dostarczenia składników odżywczych do komórek nowotworowych blokując dopływ krwi do guza. Doktorantka na podstawie dokonanego przeglądu literatury wskazała, że spośród licznych metod wytwarzania mikrocząstek, największy potencjał ma metoda emulgowania membranowego. Natomiast wykorzystanie polimeru syntetycznego, takiego jak poli(laktyd) (PLA) oraz dobór odpowiednich emulgatorów i substancji regulujących proces agregacji stanowić może prostą i wydajną metodę wytwarzania litych mikrocząstek. Co więcej, odpowiednie dodatki mogą wpływać na porowatość mikrocząstek, które mogą stanowić doskonale nośniki substancji bioaktywnych. Analiza literatury przeprowadzona przez Doktorantkę wykazała również, że mikrocząstki mogą być skutecznymi nośnikami leków białkowych, przeciwbakteryjnych, przeciwzapalnych, pulmonologicznych i innych oraz komórek. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury zawartego na 30 stronach, Doktorantka sformułowała cel pracy jakim było opracowanie uniwersalnego procesu wytwarzania biozgodnych mikrocząstek o zadanym rozkładzie średnic od 1 do 500 mikrometrów i zdefiniowanej budowie warstwy wewnętrznej i zewnętrznej jako systemów do dostarczenia i kontrolowanego uwalniania substancji, w tym leków i białek. Aktualność tematyki pracy, ze względu na potencjalne wykorzystanie w leczeniu guzów nowotworowych (embolizacji) lub jako systemów dostarczających leki w implantach do regeneracji kości po resekcji guza nowotworowego, jest bezdyskusyjna.

Elementy nowości w pracy

W literaturze można znaleźć przykłady różnych metod wytwarzania mikrocząstek, gdzie oprócz tradycyjnych metod, takich jak wytrącanie czy techniki bezpośredniego łączenia, lub suszenia rozpyłowego znajdującego bardzo szerokie zastosowanie przemysłowe, coraz większe znaczenie zyskują nowoczesne metody, takie jak techniki mikroprzepływowe czy metody emulsyjne. Choć techniki emulsyjne wymagają zazwyczaj stosowania źródeł o wysokiej energii, jak ultradźwięki czy homogenizacja prowadząc często do wzrostu temperatury emulsji, to emulgowanie membranowe prowadzone jest w łagodnych warunkach

ścinania i nie oddziałuje niekorzystnie na wrażliwe substancje. Oryginalnym pomysłem Doktorantki było zaprojektowanie modułu membranowego zintegrowanego z prostym system zbiornikowym do wytwarzania mikrocząstek. Sam moduł jest na tyle uniwersalny, że można go integrować z membranami wykonanymi z różnych materiałów i o różnych rozmiarach porów. Poprzez zastosowanie poli(kwasu mlekowego)(PLA) i nietoksycznych rozpuszczalników oraz substancji emulgujących, Doktorantka zaplanowała uzyskanie mikrocząstek litych i porowatych o zdefiniowanych zakresach średnic. Mikrocząstki zostały wzbogacone również środkiem cieniującym umożliwiającym ich wizualizację oraz związane w matrycy hydrożelu w celu uzyskania efektu przedłużonego uwalniania zawartych w nich substancji. Wytwarzanie mikrocząstek o wąskim rozrzucie średnic za pomocą specjalnie zaprojektowanego modułu stanowi o nowości pracy, co zostało udokumentowane zgłoszeniem patentowym.

Autorka wykazała, że dzięki zastosowaniu odpowiedniego składu mieszaniny emulgatorów oraz kwasu linolowego możliwe jest otrzymanie mikrocząstek o rozmiarach 10-11 μm , których średnica odpowiada średnicy naczyń włosowatych, co powinno umożliwić embolizację naczyń krwionośnych wewnątrz guza nowotworowego. Mikrocząstki takie mogą być również nośnikami leków przeciwnowotworowych, co wykazano poprzez uwalnianie modelowej substancji w środowisku o $\text{pH}=5,5$ i $7,4$. Wykorzystanie specjalnie zaprojektowanego modułu oraz przeprowadzenie szeregu eksperymentów polegających na doborze warunków procesu, pozwoliło Doktorantce na wytworzenie mikrocząstek porowatych o rozmiarach ok. 40 μm , które mogą stanowić systemy dostarczania i uwalniania białek, np. enzymów lub czynników wzrostu. Doktorantka wykazała, że dzięki umieszczeniu mikrocząstek w matrycy bio- i hemozgodnego poli(winylo piroolidonu)(PVP), można uzyskać efekt spowolnionego uwalniania substancji bioaktywnych, np. białka BMP-7, uzyskując jednocześnie efekt dyfuzji substancji do matrycy hydrożelowej. Dzięki zastosowaniu metody modyfikacji powierzchni mikrocząstek grupami aldehydowymi, możliwe było przyłączenie do ich powierzchni białek poprzez zasadę Schiffa. Co istotne, wytworzone mikrocząstki nie wykazują działania cytotoksycznego w warunkach *in vitro*, a analiza ekspresji międzykomórkowej molekuly adhezyjnej, ICAM-1 przez komórki śródbłónka ludzkiego, potwierdziła brak działania zapalnego. Doktorantka wykazała, że opracowana przez nią metoda wytwarzania mikrocząstek z poli(kwasu mlekowego)(PLA) o wąskich rozrzutach średnic i przeprowadzone badania wskazują na wysoki potencjał ich zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych.

Analiza doboru technik eksperymentalnych i metodyk badawczych

Zgodnie z opisem zawartym w rozdziale 4, Doktorantka zastosowała szereg nowoczesnych metod badawczych i analitycznych do scharakteryzowania struktury i właściwości wytworzonych mikrocząstek, m.in. reometrię ścinającą, dopplerowską elektroforezę laserową, rentgenowską analizę fluorescencyjną, cytometrię przepływową oraz szereg technik mikroskopowych: mikroskopię optyczną, fluorescencyjną, konfokalną i skaningową mikroskopię elektronową. Zastosowane metody badawcze pozwoliły Doktorantce wykazać efektywność procesu wytwarzania mikrocząstek o zdefiniowanych średnicach, morfologii i topografii powierzchni, co stanowiło jeden z kluczowych elementów bardzo szerokiego planu preparatywnego nad otrzymywaniem struktur o potencjalnej skuteczności w terapiach przeciwnowotworowych. Skuteczność opracowanej metody zamykania i uwalniania z mikrocząstek substancji aktywnych została potwierdzona w testach komórkowych.

Podsumowując, należy stwierdzić, że zastosowane techniki eksperymentalne i metody badawcze zostały dobrane w sposób trafny i odzwierciedlający eksperymentatorski charakter pracy doktorskiej.

Uwagi dyskusyjne

W pracy poruszono szereg zagadnień związanych z wytwarzaniem i charakterystyką mikrocząstek z poli(kwasu mlekowego)(PLA) w celu wytworzenia materiałów o potencjalnym zastosowaniu w embolizacji guzów nowotworowych lub systemów dostarczania leków w implantach do regeneracji kości po resekcji guza nowotworowego. Zbadane właściwości skorelowano z rodzajem i udziałem emulgatorów i innych substancji pomocniczych stosowanych w procesie wytwarzania mikrocząstek, rodzajem (masami molowymi) różnych, dostępnych komercyjnie PLA i stężeniem roztworów polimerów czy sposobem modyfikacji finalnych produktów. Praca zawiera olbrzymi materiał doświadczalny, opracowany w postaci licznych tabel, wykresów i histogramów.

Dyskusja wyników i wnioski są poprawnie sformułowane i są potwierdzeniem założonej hipotezy badawczej. Odzwierciedlają one również bogactwo wyników z prac preparatywno-eksperymentalnych zawartych w pracy. Niektóre z nich zostały zawarte w publikacjach, zgłoszeniu patentowym i w materiałach konferencyjnych, w których Doktorantka jest współautorem.

Układ pracy jest zasadniczo tradycyjny, i na samym początku przedstawia cel i zakres pracy, jednak byłby bardziej logiczny gdyby na samym początku zawierał opis stanu wiedzy, z którego jasno wynikałyby przesłanki do podjęcia określonego problemu badawczego. Opisując

materiały i metody badawcze, Doktorantka wielokrotnie opisuje tę samą metodę lub aparaturę, co czyni ten fragment zbyt obszernym, a powtórzenia zbędnymi.

Doktorantka zaprojektowała mikrocząstki zawierające substancje bioaktywne i osadzone w matrycy hydrożelowej. Docelowo, miałyby one stanowić powłoki zewnętrznych powierzchni implantów metalicznych, jak opisuje w pracy nr 2 w wykazie publikacji własnych. Jakie metody Doktorantka wykorzystałaby w celu osiągnięcia adhezji hydrożelu do powierzchni implantu tytanowego lub jego stopu?

Doktorantka nie ustrzegła się również drobnych błędów edytorskich, których nie będę przytaczać w recenzji dotyczącej już opublikowanej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że nie wnoszę zasadniczych uwag do interpretacji wyników i sposobu przeprowadzenia badań. Przedstawione uwagi o charakterze dyskusyjnym nie umniejszają w sposób znaczący wartości pracy.

Wnioski końcowe

Doktorantka zrealizowała bardzo obszerny program badań eksperymentalnych, uzyskując interesujące wyniki o niepodważalnych znamionach nowości naukowej. Praca wnosi cenny wkład w aspekty projektowania aparatury i wykorzystywania narzędzi inżynierii chemicznej na drodze do otrzymywania mikrocząstek polimerowych o dobrze zdefiniowanych rozmiarach i morfologii powierzchni o potencjalnym zastosowaniu w embolizacji guzów nowotworowych lub systemów dostarczania leków w implantach do regeneracji kości po resekcji guza nowotworowego. Doktorantka znacząco poszerzyła wiedzę na temat wpływu parametrów wytwarzania i modyfikacji mikrocząstek z poli(kwasu mlekowego) na ich morfologię i właściwości biologiczne w warunkach *in vitro*.

Biorąc pod uwagę osiągnięte wyniki, stwierdzam iż przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Ilony Łojarczyk spełnia warunki przewidziane ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 192 ust. 2, Dz.U. poz. 1668, z późn. zm.) oraz art. 180 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. poz. 1669, z późn. zm.). Dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Ilony Łojarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.



Szczecin, 29.01.2021 r.