

Szczecin 4 stycznia, 2018

Prof. dr hab. inż. Artur Bartkowiak  
Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych  
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Ocena pracy doktorskiej p. mgr inż. Barbary Kupikowskiej-Stobba  
p.t.: „**A one-step electrostatic method for encapsulation of cells in alginate-polyethersulfone microcapsules**”

wykonanej w Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN w Warszawie  
pod kierunkiem dr hab. inż. Doroty Lewińskiej, prof. nadzw. IBIB PAN

Podstawą opracowania oceny jest:

- pismo Pani Z-cy Dyrektora Instytutu ds. Naukowych IBIB PAN – prof. dr hab. Doroty Pijanowskiej (SRN/003/124/2018) z dnia 5 listopada 2018 roku, która na wniosek Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN w Warszawie zwróciła się do mnie o dokonanie recenzji ww. pracy doktorskiej;
- praca doktorska mgr inż. Barbary Kupikowskiej-Stobba
- dodatek do rozprawy z oświadczeniami współautorów publikacji naukowych wchodzących w skład ocenianej rozprawy.

**Ogólna charakterystyka rozprawy**

Na opiniowaną rozprawę składa się cykl 6 oryginalnych prac naukowych obejmujących w jednorodny sposób zagadnienie dotyczące opisu jednoetapowego procesu enkapsulacji w procesie potrójnej koekstruzji w układzie roztworowym alginian/gliceryna/polietersulfon i możliwości jego wykorzystania do bioimmobilizacji żywych komórek.

Publikacje ukazały się w latach 2009-2017 zarówno w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (4 pozycje) oraz wydawnictwach krajowych (2 pozycje).

W przytoczonych dwóch pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, natomiast w pozostałych czterech jest kolejno: raz drugim, dwa razy trzecim i raz czwartym współautorem. Wszystkie prace mają od 3 do 6 współautorów. Z dołączonych do pracy doktorskiej specjalnych oświadczeń wynika, że wkład mgr inż. Kupikowskiej-Stobba w ich opracowanie był znaczący, aczkolwiek niestety oświadczenia współautorów nie określają precyzyjnie w jakim udziale % współautorzy potwierdzają swój udział w przygotowanych publikacjach, co niewątpliwie utrudnia jednoznaczne weryfikację i co za tym idzie ocenę rzeczywistego udziału Doktorantki w poszczególnych pracach. Wartość punktowa cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe Doktorantki wg klasyfikacji czasopism punktowanych MNiSzW wynosi 80, przy czym sumaryczny współczynnik wpływu IF w bazie JCR na rok ukazania się publikacji dla 4 spośród 6 wskazanych publikacji wyniósł 3,769.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 100 stron i została podzielona po wprowadzeniu obejmującym streszczenie, indeks skrótów oraz listę publikacji wchodzących w zakres przedstawionej do ocen pracy na 4 zasadniczych części: wstęp obejmujący część teoretyczną z przeglądem literatury, II – cele i założenia badawcze, III – część

eksperymentalną i IV – wnioski, po czym jest lista przytaczanych w tekście 374 publikacji i na zakończenie kserokopie wszystkich 6 prac będących integralną częścią rozprawy doktorskiej.

Układ pracy jest typowy dla opracowań badawczo-naukowych, aczkolwiek budzi moje pewne zdziwienie brak wydzielonych jako oddzielnych rozdziałów części doświadczalnej (materiały i metody) oraz części poświęconej prezentacji wyników wraz z ich krytyczną dyskusją w świetle wyników prac innych autorów. Niestety płynne przejście w części literaturowej od omówienia wyników prac innych autorów prezentowanych do strony 49 do opisów prac bezpośrednio związanych z metodą wykorzystywaną przez autorkę (poza lit. 350 – patent PL 208383: Lewińska, Chwojnowski, Jankowska-Śliwińska, Weryński, strona 49) i opisem w dalszej części kolejno samego procesu otrzymywania kapsuł metodą potrójnej koekstruzji oraz metod ich badania powoduje brak właściwego odniesienia jakie wyniki były autorstwem Doktorantki a jakie innych autorów. Na przykład czy zamieszczone zdjęcie nr 21 na stronie 51 powstało w ramach realizacji pracy doktorskiej czy jest wynikiem prac innych autorów (brak stosownego odniesienia literaturowego). Uważam, że zamieszczone opisy wraz z wstępną próbą dyskusji własnych wyników ze stron 50-55 powinny być umieszczone w dalszych częściach pracy m.in. na początku rozdziału III w części eksperymentalnej poświęconej materiałom i metodom użytym w pracy. Autorka w tekście bardzo często powołuje się na opisy, tabele i rysunki z własnych publikacji umieszczonych na końcu pracy, gdzie szukanie informacji rozrzuconych w różnych częściach dokumentu jest dość uciążliwe i powoduje utratę płynności śledzenia toku dysertacji.

Tytuł rozprawy jest sformułowany prawidłowo i przejrzysty. Treść pracy jest zgodna z jej tytułem a problematyka poruszona w kolejnych rozdziałach odzwierciedla informacje zawarte w poszczególnych publikacjach. Autorka ogólnie zachowała poprawne proporcje wielkości rozdziałów, jednakże wydaje się celowe zmiana kolejności niektórych fragmentów pracy o jakich wspominałem już wcześniej.

### **Ocena trafności celów rozprawy**

W okresie ostatnich kilkunastu lat można zaobserwować wzrastające zainteresowanie wykorzystaniem procesów bioimmobilizacji żywych komórek do opracowywania nowych rozwiązań i tworzenia nowych produktów w tym biomateriałów do zastosowań biomedycznych. W chwili obecnej wykorzystywane materiały i proponowane procesy muszą spełniać określone wymogi by być efektywnie stosowane do tworzenia samych nośników i aby gwarantowały długotrwałą żywotność zamykanych komórek. Jednym z wyzwań dla nowo opracowywanych metod kapsułkowania jest zagwarantowanie wystarczającej wytrzymałości mechanicznej i odporności chemicznej przy zdefiniowanej porowatości, braku biotoksyczności oraz wysokiej biogodności materiału kapsułki zarówno w stosunku do immobilizowanych komórek jak i środowiska w jakim będą one docelowo funkcjonować. Poszukiwania takich uniwersalnych metod kapsułkowania szczególnie w kontekście ich długotrwałego funkcjonowania w zmiennych warunkach środowiska np. ludzkiego ciała są prowadzone od wielu lat i jak dotychczas nie doprowadziły do opracowania jednej uniwersalnej metody spełniającej wszystkie powyższe wymagania.

Dlatego uważam, że wybór tematu pracy doktorskiej przez mgr inż. Barbarę Kupikowską-Stobba dotyczący weryfikacji nowej oryginalnej jednoetapowej elektrostatycznej metody enkapsulacji komórek w biokompatybilnych mikrokapsułkach alginianowo-polieterosulfonowych o bardzo wysokiej wytrzymałości mechanicznej jako celowy i trafny.

Szczegółowe cele rozprawy można ująć w następujących dwóch zagadnieniach:

- określenie zależności pomiędzy zmiennymi parametrami procesu enkapsulacji a wielkością, jednorodnością rozmiaru, kształtem i strukturą wewnętrzną mikrokapsułek;
- potwierdzenie przydatności opracowanej metody elektrostatycznej do enkapsulacji żywych komórek szczególnie w kontekście utrzymania ich wysokiej zdolności do namnażania się.

Biorąc pod uwagę zarówno poznawczą, jak i aplikacyjną wartość zaplanowanych badań, należy podkreślić, że cel postawiony w rozprawie jest silnie osadzony w problematyce opracowania nowych, funkcjonalnych biomateriałów i poszerzy współczesną wiedzę dotyczącą nowych metod i materiałów wykorzystywanych w bioimmobilizacji żywych komórek.

### **Merytoryczna ocena rozprawy**

Publikacje składające się na rozprawę doktorską mgr inż. Barbary Kupikowskiej-Stobba ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych i zostały już wcześniej zaopiniowane w procesie wydawniczym, dlatego rola recenzenta rozprawy jest w takim przypadku ograniczona i sprowadza się do wykazania związku tematyki tych publikacji z celem rozprawy, a ponadto udziału Doktoranta w ich powstaniu.

Publikacje są zaprezentowane w rozprawie w kolejności przedstawiającej postęp w realizacji badań i można je podzielić na dwie grupy.

Do pierwszej należy zaliczyć cztery publikacje (I-IV) dotyczące wpływy wybranych parametrów na właściwości mikrokapsułek alginianowo-polieterosulfonowych. W kolejnych pracach zweryfikowano wpływ dotychczas nigdzie nie opisanych w literaturze następujących parametrów: skład i stężenie roztworów tworzących strukturę formowanej kropelki (publikacja I), parametry elektryczne procesu (publikacja II), przepływ cieczy (publikacja III) oraz napięcie powierzchniowe cieczy żelującej (IV) na budowę i strukturę otrzymanych kapsułek.

Przeprowadzone badania wykazały, że wzrost wszystkich parametrów elektrycznych procesu powoduje spadek wielkości oraz jednorodności wielkości i kształtu formowanych kapsułek. Dzięki odpowiedniemu doborowi parametrów przepływu cieczy zarówno tworzącej membranę jak i rdzeń można zmieniać grubość zewnętrznej otoczki w szerokim zakresie od 20 do 500  $\mu\text{m}$ . Skład roztworów membranotwórczego wpływa w sposób zasadniczy na wielkość i strukturę porów membrany. Natomiast napięcie powierzchniowe cieczy w łaźni żelującej oraz lepkość roztworu membranotwórczego wpływa na kształt i geometrię formowanych mikrokapsułek, gdzie przy odpowiednio wysokiej lepkości roztworu tworzącego zewnętrzną powłokę kropelki nie ma konieczności stosowania surfaktanta. Wyniki opisane w pierwszych czterech pracach pozwoliły na takie ustalenie zmiennych parametrów tworzenia mikrokapsułek alginianowo-polieterosulfonowych, aby formowane materiały były sferyczne bez deformacji membrany oraz obecności frakcji satelitarnych małych kapsułek, posiadały zdefiniowane średnice zewnętrzne i wewnętrzne rdzenia.

Do drugiej grupy publikacji można zaliczyć dwie publikacje (V i VI), których celem była weryfikacja przydatności opracowanej elektrostatycznej metody koekstruzji do enkapsulacji żywych komórek, a w szczególności czy zaproponowane warunki procesu wpływają na zdolność komórek do namnażania się (publikacja V) wraz z opracowaniem i weryfikacją skuteczności metody odzyskiwania komórek z kapsułek w celu określenia ich przeżywalności. Przeprowadzone badania potwierdziły, że opracowana metoda potrójnej elektrostatycznej

koekstruzji pozwala na zachowanie wysokiej żywotności kapsułkowanych komórek modelowych drożdży na poziomie nawet 98%.

Metody analityczne zostały przyjęte i zastosowane w pracy w sposób prawidłowy adekwatnie do wskazanego zakresu i przedmiotu analizy. Wszystkie zastosowane metody otrzymywania mikrokapsuł oraz charakteryzacji ich właściwości zostały opisane w publikacjach w sposób bardzo przejrzysty i wyczerpujący. Na uwagę zasługują wykorzystanie opracowanej przez Doktorantkę i opatentowanej oryginalnej metody badania stopnia przeżywalności immobilizowanych żywych komórek w kapsułkach o nieprzezroczystych i mechanicznie bardzo wytrzymałych membranach.

Szkoda, że Doktorantka w części dyskusyjnej tylko w niewielkim stopniu porównuje i odnosi się do wyników prac innych autorów w kontekście opisu struktury i właściwości otrzymanych kapsuł o budowie rdzeń/membrana z otoczką z polimerów nierozpuszczalnych w wodzie na hydrożelowych rdzeniach alginianowych w wyniku procesu wytrącania na granicy faz tzw. „separacji fazowej”. Znane są z literatury między innymi liczne przytaczane prace dla układów poliakrylanowych HEMA-MMA zaproponowane po raz pierwszy przez Seftona, który był prekursorem tego procesu enkapsulacji ponad 20 lat temu oraz co bardziej istotne opisany bardzo zbliżony układ mikrokapsulek PES/alginian co do składu i ostatecznej struktury, ale otrzymany w wyniku bezpośredniego procesu powlekania polieteosulfonu na hydrożelowych mikrokulkach alginian/ $\text{Ca}^{2+}$  poprzez zanurzenie w roztworze PES w N,N-dimetyloacetamidzie, krótkie podsuszenie na powietrzu i wymuszonej separacji poprzez przemycie w wodzie, opisany w publikacji z 2008 roku:

Yijia Zhang, Qiang Wei, Chuanbin Yi, Changyu Hu, WeiFeng Zhao, Changsheng Zhao, Preparation of Polyethersulfone–Alginate Microcapsules for Controlled Release, Journal of Applied Polymer Science, 2009, Vol. 111, 651–657.

Podsumowując merytoryczną ocenę rozprawy należy stwierdzić, że prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Barbary Kupikowskiej-Stobba są tematycznie jednorodne, dobrze zaplanowane i cechuje je profesjonalizm badawczy. Podkreślić należy dobry warsztat badawczy Doktorantki, umiejętność doboru i opanowania szeregu różnorodnych i specjalistycznych metod badawczych oraz weryfikacji uzyskanych wyników.

### **Ocena wartości naukowej i praktycznej rozprawy**

W swojej rozprawie doktorskiej mgr inż. Barbara Kupikowska-Stobba rozwiązała postawione zadania badawcze i osiągnęła założone cele pracy, planując oraz realizując doświadczenia w sposób zgodny z wymaganiami współczesnej nauki. Doktorantka w sposób przejrzysty przedstawiła problem badawczy rozprawy w świetle obecnego stanu wiedzy przywołując ponad 360 publikacji naukowych innych autorów, wskazała na trendy rozwojowe w wykorzystaniu procesów bioenkapsulacji oraz potrzeby w tym zakresie, wynikające z ograniczeń obecnie stosowanych procesów oraz formowanych sferycznych materiałów przy ich zastosowaniu.

Jednocześnie, wyniki swoich badań Doktorantka przedstawiła w sześciu opublikowanych pracach naukowych, gdzie w sposób przejrzysty zaprezentowała kluczowe wyniki badań. Prace te mają dużą wartość poznawczą i wysoki potencjał aplikacyjny.

W opinii recenzenta, do najważniejszych naukowych i praktycznych osiągnięć ocenianej pracy należy wykazanie, że:

- struktura mikrokapsuł alginian/polietersulfon otrzymywane w procesie potrójnej koekstruzji z wykorzystaniem glicerolu jako dodatkowej interfazy zależy od większości badanych w pracy zmiennych parametrów procesu;

- dobór właściwych elektrycznych parametrów procesów tzn. napięcia, częstotliwości i czasu trwania impulsów zastosowanego prądu umożliwia otrzymanie kapsuł o regulowanej wielkości w zakresie 0,8-2,8 mm;
- dobór właściwej lepkości roztworów wchodzące w skład wkraplanych kropeł pozwala na zmniejszenie ilości surfaktantów w cieczy żelującej;
- opracowana metoda pomimo zastosowania rozpuszczalników i substancji o potencjalnie niekorzystnym wpływie na żywe komórki pozwala na wysoką efektywność procesu z punktu widzenia przeżywalności immobilizowanych modelowych komórek drożdży.

### **Ocena formy edytorskiej rozprawy**

Rozprawa doktorska mgr inż. Barbary Kupikowskiej-Stobba jest przygotowana w postaci spójnego tematycznie zbioru opublikowanych prac naukowych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem lub współautorem. Całość jest poprzedzona obszernym 100-stronicowym opracowaniem o strukturze zbliżonej do klasycznej rozprawy doktorskiej.

Jakość edytorska opracowań już opublikowanych nie budzi zasadniczych zastrzeżeń. Od strony graficznej praca jest wykonana starannie, z czytelnymi tabelami oraz rysunkami i zdjęciami. W przypadku tych ostatnich w celu wiarygodnego porównania i właściwej interpretacji prezentowanych struktur na zdjęciach SEM i klasycznej mikroskopii optycznej powinny być stosowane te same powiększenia i wskazywane skale odniesienia (np. Fig. 29-31, 34, 35, 40).

W pracy pojawiają się tylko nieliczne błędy interpunkcyjne, nieprawidłowe określenia i niedociągnięcia edytorskie. Na przykład w umieszczonym na początku spisie treści Doktorantka pominęła zarówno część II swojej pracy tzn. cele i założenia badawcze jak i wykaz publikacji. Chciałbym także zwrócić uwagę na niejednolity zapis spisu literatury oraz pojawiające błędy interpunkcyjne (np. brak kropek, przecinków w przytoczonych pozycjach literaturowych np. pozycje 1, 6, 13, 15, 16, 19, 20 itd.).

### **Szczegółowe uwagi dotyczące treści rozprawy i zagadnienia do dyskusji w czasie obrony:**

- We wstępie części eksperymentalnej na stronie 59 rozprawy Autorka wskazuje, że podczas tworzenia kapsuły na etapie separacji fazowej w wodnym roztworze, do jakiego są wkraplane kropelki, gliceryna występująca w warstwie środkowej przenika gwałtownie na zewnątrz kapsułki poprzez tworzącą się spontanicznie warstwę porowatej zewnętrznej membrany PES. Proszę uargumentować to stwierdzenie i potwierdzić, że dyfuzja nie odbywa się także do środka czyli w kierunku rdzenia tzn. roztworu alginianu i że faktycznie ten proces jest wolniejszy niż dyfuzja na zewnątrz kapsułki?
- Proszę o wyjaśnienie, czym kierowano się przy wyborze standardowych warunków „odniesienia” przy badaniu wpływu zmiennego napięcia, częstotliwości i czasu trwania impulsów? (np. dlaczego po zweryfikowaniu wpływu napięcia w zakresie 0-13 kV zastosowano w kolejnych badaniach wpływu częstotliwości napięcie 15 kV a w badaniach zmiennego czasu trwania impulsów napięcie o wartości aż 17 kV i częstotliwość 20 kHz?)
- Proszę o wyjaśnienie czym kierowano się podczas wyboru optymalnego ciężaru cząsteczkowego PVP (wybrano PVP40 – opis strona 61 rozprawy) w kontekście interpretacji struktury membran obserwowanych na zdjęciach (Fig. 30).

- Czy były prowadzone lub są znane wyniki badania wpływu składu i właściwości samego rdzenia (np. ciężar cząsteczkowy i stężenie alginianu sodu) na właściwości formowanych kapsułek)?
- Na podstawie wyników pracy proszę o określenie jakie parametry procesu będą decydowały o otrzymaniu sferycznych kapsułek o rozmiarach poniżej 1 mm średnicy z zachowaniem równomiernej grubości membrany (jakie parametry są najważniejsze i co należałoby zmienić aby otrzymać kapsułki o lepszych parametrach)?
- Czy można porównać wyniki prac prowadzonych dla podobnych układów w procesach koekstruzji (podwójna vs potrójna koekstruzja). Jakie są zalety a jakie ograniczenia potrójnej koekstruzji?
- Czy może Pani porównać wydajność zaproponowanego procesu w kontekście innych znanych metod tworzenia kapsułek i w jaki sposób jest możliwie docelowe zwiększenie wydajności takiej metody enkapsulacji?

Wszystkie przytoczone powyżej uwagi wynikają z moich jako recenzenta wątpliwości oraz pytań do dyskusji w trakcie obrony pracy. Jednakże w tym miejscu chciałem podkreślić moją opinię na temat wysokiego poziomu merytorycznego pracy doktorskiej mgr inż. Barbary Kupikowskiej-Stobba

Podsumowując: przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest bardzo trafną próbą poszukiwania i doboru właściwych warunków procesu otrzymywania stabilnych biokompozytowych materiałów kompozytowych typu mikrokapsułki o budowie rdzeń/otoczka z wykorzystaniem jednoetapowej metody potrójnej koekstruzji.

Zaproponowany w pracy proces formowania mikrokapsułek w jednoetapowym procesie potrójnej koekstruzji jak i same otrzymywane nośniki o budowie rdzeń otoczka o bardzo wysokiej wytrzymałości mechanicznej i odporności chemicznej stanowią bardzo ciekawą alternatywę dla dotychczas stosowanych nośników do bioimmobilizacji żywych komórek. Praca jest ściśle związana z technologią biomateriałów a konkretnie z poszukiwaniem nowych rozwiązań materiałowych i procesowych w celu formowania produktów o potencjalnym zastosowaniu w przemyśle medycznym co zostało m.in. wykazane w ramach przedstawionej do oceny pracy.

Zaprezentowane ostateczne stwierdzenia i wnioski końcowe są interesujące zarówno z punktu widzenia poznawczego m.in. dotyczą krytycznej weryfikacji wpływu licznych parametrów procesowych na właściwości otrzymanych mikrokapsułek jak i praktycznego ze względu na duży potencjał aplikacyjny zaproponowanych mikrokapsułek alginianowo-polietersulfonowych w różnorodnych zastosowaniach biomedycznych ze względu na ich wysoką wytrzymałość mechaniczną oraz stabilność chemiczną w zmiennych warunkach środowiska zewnętrznego przy niskiej biotoksyczności.

### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

Po szczegółowym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr inż. Barbary Kupikowskiej-Stobba pt. "A one-step electrostatic method for encapsulation of cells in alginate-polyethersulfone microcapsules", stwierdzam, że jest ona oryginalnym i znaczącym wkładem naukowym do działu wiedzy, której dotyczy. Pani mgr Kupikowska-Stobba dowiodła w rozprawie, że jest badaczem dysponującym wiedzą teoretyczną oraz umiejętnościami praktycznymi w zakresie technologii biomedycznej, szczególnie w obszarze procesów tworzenia i charakteryzacji właściwości nowych biomateriałów typu hybrydowego. Cel postawiony w pracy doktorskiej został osiągnięty, a jej wyniki wniosły do nauki elementy

poznawcze i praktyczne, co także zostało potwierdzone rangą czasopism naukowych w których opublikowane przez Doktorantkę dysertacji wyniki badań uzyskały pozytywne recenzje.

Niniejszym po zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą doktorską oraz na podstawie oceny indywidualnego wkładu Pani mgr inż. Barbary Kupikowskiej-Stobba w powstaniu przedstawionych do oceny publikacji stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi formalne stawiane tego typu opracowaniom zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 (Dz. U. Nr 65, poz 595 wraz z późniejszymi zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym wnoszę do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr inż. Barbary Kupikowskiej-Stobba do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

DYREKTOR  
Centrum Biofizyki i Innowacyjnych  
Materiałów Opakowaniowych  
Prof. dr hab. inż. Artur Bartkowiak