



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 Pana **mgra inż. Kamila Kopcia**

pt.: **„Otrzymywanie pokryć z polidopaminy i jej analogów do funkcjonalizacji powierzchni wyrobów medycznych”**

zrealizowanej pod kierunkiem promotora,
prof. dr hab. inż. Tomasza Ciacha

w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych i w dyscyplinie inżynieria chemiczna

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały podjętej przez Radę Naukową
Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska powstała w oparciu o wyniki badań zawartych w 5 publikacjach opublikowanych w czasopismach wymienionych w *Journal of Citation Reports (JCR)*. Wszystkie artykuły zostały wydane w latach 2020-2023, w czterech pracach Doktorant jest pierwszym współautorem, a w dwóch jest autorem korespondencyjnym. Praca składa się z 9 rozdziałów poprzedzonych streszczeniem (w języku polskim i angielskim), a następnie Autor zamieścił wprowadzenie, przedstawił cel pracy i zakres badań. Opis przeprowadzonych prac badawczych i otrzymanych wyników został poprzedzony wstępem literaturowym dotyczącym problematyki funkcjonalizacji powierzchni wyrobów medycznych z wykorzystaniem polidopaminy. Doktorant w zwięzły sposób omówił zawartość poszczególnych artykułów, przedstawiając wyciągnięte wnioski i wykaz literatury. Pracę kończą przedruki publikacji oraz informacje Doktoranta dotyczące zakresu wykonanych prac badawczych oraz Jego wkładu w przygotowanie publikacji. Niniejsza recenzja zawiera ocenę merytoryczną i naukową pracy doktorskiej w odniesieniu do aktualności i nowości podejmowanych zagadnień badawczych, poprawności doboru metod badawczych oraz technik eksperymentalnych.

Aktualność tematu pracy

Doktorant zajął się tematyką funkcjonalizacji powierzchni wyrobów medycznych mającej na celu poprawę ich biogodności i funkcjonalności. Różnorodność materiałów stosowanych do wytwarzania implantowalnych wyrobów medycznych (protez, rusztowań dla potrzeb inżynierii tkankowej) sprawia, że kluczowa kwestia biogodności rozumiana jako właściwość systemu: materiał-tkanki lub składniki tkanek wymaga dodatkowych zabiegów, których celem jest uzyskanie odpowiedniej zdolności materiału do działania zgodnie z reakcją gospodarza w konkretnym zastosowaniu. W przypadku materiałów hydrofobowych, jaką jest większość syntetycznych polimerów, modyfikacja powierzchni takich wyrobów medycznych sprzyja poprawie oddziaływań w układzie materiał-komórki. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury, Doktorant stwierdził, że największy potencjał w tym obszarze ma polidopamina (PDA), hydrofilowy biopolimer zawierający grupy katecholowe, chinonowe i aminowe zdolne do przyłączania się z różnymi powierzchniami i nadający modyfikowanym powierzchniom hydrofilowy charakter. Co więcej, Doktorant stwierdził, że analogi strukturalne PDA w postaci fenyloamin zawierających grupę aminową połączoną krótkim łańcuchem alifatycznym z pierścieniem aromatycznym powinny sprzyjać utworzeniu w reakcji utleniania ugrupowania katecholowego. Choć prace dotyczące hydroksylacji pierścienia aromatycznego w reakcji Fentona są znane, to Doktorant po raz pierwszy zaproponował modyfikację L-tyrozyny, L-fenyloalaniny i 2-fenyloetyloaminy.

Doktorant, na podstawie dokonanego przeglądu literatury, zajął się badaniami nad funkcjonalizacją powierzchni wyrobów medycznych za pomocą polidopaminy i jej analogów strukturalnych w kierunku hydrofilizacji powierzchni różnych materiałów (głównie hydrofobowych polimerów) i tym samym zwiększenia adhezji i proliferacji komórek. Doktorant zaplanował i wykonał badania, których głównym celem było ustalenie najkorzystniejszych parametrów procesowych wytwarzania powłok, w tym skrócenia czasu ich wytwarzania w odniesieniu do znanych, długotrwałych metod, dokonanie analizy właściwości zmodyfikowanych powierzchni materiałów o różnych geometriach oraz ocena właściwości biologicznych z wykorzystaniem różnych linii komórkowych. Finalnie, Doktorant wykorzystał komercyjnie dostępne wyroby medyczne w postaci dzianych protez naczyniowych i rusztowań kostnych w celu weryfikacji skuteczności procesu pokrywania ich powierzchni warstwą aktywnej biologicznie polidopaminy. Celem prac Doktoranta było również opracowanie metody otrzymywania nowych pokryć o właściwościach analogicznych do polidopaminy, ale wytwarzanych z innych fenyloamin. Aktualność tematyki pracy jest bezdyskusyjna i wpisuje się w zagadnienia procesu projektowania produktów chemicznych i wyrobów medycznych z punktu widzenia produkcji przemysłowej i inżynierii chemicznej.

Analiza doboru technik eksperymentalnych i metodyk badawczych

Głównym zadaniem badawczym Doktoranta było znalezienie najbardziej efektywnej metody syntezy polidopaminy za pomocą wybranego czynnika utleniającego i dobór parametrów procesowych, takich jak pH, stężenie chlorowodoru dopaminy czy temperatura w celu wytworzenia warstwy o odpowiedniej grubości i w jak najkrótszym

czasie. Kluczowym elementem prac badawczych zrealizowanych przez Doktoranta było wykonanie pokryć na takich materiałach jak poli(dimetylosiloksan)(PDMS), poli(tetrafluoroetylen)(PTFE), poliuretan (PU), stal nierdzewna (SS), poli(laktyd (PLA), poli(L-laktyd-co-glikolid)(PLGA), a zwłaszcza na matach włóknistych z PU, cylindrycznych protezach naczyniowych wykonanych z PTFE i PU oraz rusztowań z mikrogranulatów PLA. Doktorant bardzo skrupulatnie zaprojektował program badawczy i trafnie dobrał odpowiednie techniki instrumentalne, takie jak spektroskopię w podczerwieni (IR), spektrofotometrię UV czy metody mikroskopowe, w tym mikroskopię sił atomowych (AFM) i skaningową mikroskopię elektronową (SEM) w celu wyjaśnienia budowy chemicznej i opisanie właściwości fizykochemicznych i strukturalnych pokryć. Ważną częścią zrealizowanych prac były badania biologiczne z wykorzystaniem różnych linii komórek ssaków, w tym komórek mysich fibroblastów linii L929 i ludzkich komórek mięśni gładkich (ang. *Smooth Muscle Cells*, SMC), gdzie te ostatnie były testowane dla materiałów zawierających dodatkowo przyłączony peptyd VAPG. Doktorant przeprowadził hodowle ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) na zmodyfikowanych polidopaminą powierzchniach PTFE, PU i protez naczyniowych pokrytych PDA z/bez przyłączonej żelatyny. Ponadto, zbadał możliwość wzrostu komórek ludzkiego kostniakomięsa linii MG-63 oraz ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. *Mesenchymal Stem Cells*, MSC) na powierzchni zmodyfikowanych PDA rusztowań kostnych wykonanych z mikrogranulatów PLA. W tych badaniach Doktorant zastosował obrazowanie za pomocą laserowej mikroskopii konfokalnej (ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM).

Oprócz licznych technik eksperymentalnych Doktorant wykorzystał narzędzia planowania eksperymentów metodą Boxa-Behnkena i oprogramowania przy pracach badawczych związanych z wytwarzaniem pokryć analogicznych do PDA na podstawie fenyloaminy. Doktorant w sposób bardzo umiejętny dobrał techniki badawcze, które są adekwatne do zaplanowanych eksperymentów. Bezspornie wskazuje to na bardzo dobre poruszanie się Doktoranta w przedmiocie rozprawy. Ważnym elementem wartym podkreślenia jest interdyscyplinarny charakter recenzowanej pracy doktorskiej.

Elementy nowości w pracy

Otrzymywanie pokryć z polidopaminy i jej analogów do funkcjonalizacji powierzchni wyrobów medycznych stanowi ważny kierunek badań nad poprawą biogodności metali, ceramiki i polimerów, zwłaszcza ochroną przed wystąpieniem odpowiedzi immunologicznej organizmu, infekcji lub powstawania skrzepów krwi. Doktorant wytypował do badań polidopaminę ze względu na korzystny jej wpływ na adhezję komórek poprzez hydrofilizację powierzchni. Doktorant opracował nową metodę otrzymywania pokryć z polidopaminy w znacząco krótszym czasie (tj. 1 godziny) przy uzyskaniu warstwy o grubości porównywalnej do tej, jaką można wytwarzać w znanym procesie (24 godziny) i dodatkowo charakteryzującej się mniejszą chropowatością (wyniki zostały przedstawione w pracy opublikowanej w *ACS Omega*, 2022). Zastosował metodę polimeryzacji wybranych związków poprzez hydroksylację pierścienia aromatycznego w reakcji Fentona z użyciem czynnika utleniającego, jakim były rodniki hydroksylowe generowane przy zastosowaniu nadtlenu wodoru i chlorku żelaza (II).

Doktorant dokonał doboru parametrów procesu, takich jak stężenie, temperaturę i wartość pH aby uzyskać pokrycia o grubości porównywalnej uzyskiwanej w najczęściej stosowanym procesie oraz o jak najmniejszej chropowatości. Warto podkreślić, że opracowana metoda otrzymywania pokryć z wykorzystaniem analogów dopaminy, czyli L-tyrozyny, fenyloalaniny i fenyloetyloaminy stała się przedmiotem zgłoszenia patentowego (udzielony patent w 2021 roku).

Nowością recenzowanej pracy jest zaproponowanie przez Doktoranta mechanizmu kowalencyjnej polimeryzacji oksydacyjnej L-tyrozyny z uwzględnieniem niekowalencyjnych interakcji pomiędzy monomerami i rozszerzeniem tego mechanizmu dla wyjaśnienia procesu wytwarzania pokryć z pozostałych fenyloamin, czyli polifenyloalaniny oraz polifenyloetyloaminy. Doktorant wykazał również, że nowe pokrycia z polikatecholamin, wytworzone według metody opracowanej w ramach pracy doktorskiej, w sposób znaczący zwiększyły podatność badanych materiałów na porastanie komórkami HUVEC. Oznacza to, że pokrycia z PTYR, PFA i PEA mogą potencjalnie być zastosowane do modyfikacji wyrobów medycznych, takich jak protezy naczyniowe.

Doktorant wykazał ponadto, że wytworzone powłoki z PDA znacząco zwiększają adhezję i wzrost komórek HUVEC, umożliwiając pełne porośnięcie komórkami materiału opornego na adhezję i wzrost komórek jakim jest PTFE. Ponadto, osadzone powłoki doprowadziły do zwiększenia ilości komórek na powierzchni poliuretanów. Co więcej, Doktorant wykazał, że możliwe jest sterowanie proliferacją komórek na powierzchniach selektywnie pokrywanych polidopaminą i niezależnie od rodzaju podłoża, przy znaczącym ograniczeniu adhezji do podłoża PTFE, które charakteryzują się niską energią powierzchniową. Wykazał również, że PDA w bardzo dobrym stopniu zwiększa podatność powierzchni materiałów na adhezję komórek SMC, bez potrzeby dodatkowej funkcjonalizacji powierzchni za pomocą drogich peptydów. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *ACS Omega*, 2023.

Ponadto, Doktorant wykazał, że adhezja komórek fibroblastów do podłoży nanowłóknistych wykonanych z PU i pokrytych powłokami PDA otrzymanymi w nowo opracowanym procesie była porównywalna do wyników uzyskanych dla powłok wytwarzanych w tradycyjny sposób. Wyniki opublikowano w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, 2020.

Nowością recenzowanej pracy było również wykorzystanie pokryć z PDA na nanowłóknistych matach PU do kowalencyjnego przyłączenia żelatyny. Dla tak zmodyfikowanych powierzchni wyrobów medycznych w postaci protez naczyniowych, Doktorant osiągnął pełną konfluencję komórek HUVEC już po 7 dniach. Szczegółowa prezentacja wyników i dyskusja została przeprowadzona na łamach w renomowanego czasopisma *Biomaterials Advances*, 2022.

Co więcej, wytworzone powłoki nową metodą po naniesieniu ich na mikrogranulaty wykonane z PLA z dodatkiem fosforanu β -trójwapniowego wykazały również korzystny wpływ na wzrost komórek MG-63, co manifestowało się zwiększoną produkcją włókien elastyny i podwyższoną aktywnością fosfatazy alkalicznej. Wyniki tych badań zostały również opublikowane również w *Biomaterials Advances*, 2023.

Uwagi dyskusyjne

Recenzowana praca zawiera bogaty materiał eksperymentalny, który posłużył do realizacji głównego celu pracy, jakim był dobór parametrów procesowych dla wytwarzania pokryć z polidopaminy przy znacząco zredukowanym czasie w porównaniu do najczęściej stosowanej metody. Założeniem było wykorzystanie nowej metody do wytwarzania pokrycia z PDA na powierzchni różnych materiałów, takich jak PDMS, PTFE, PU, SS, PLA i PLGA o zróżnicowanej geometrii. Doktorant zajął się również opracowaniem metody wytwarzania nowych pokryć poprzez oksydacyjną polimeryzację wytypowanych fenyloamin, które prowadzą do hydrofilizacji powierzchni pokrywanych materiałów oraz sprzyjają proliferacji komórek HUVEC. Dyskusja uzyskanych wyników badań i wnioski są dobrze sformułowane i w pełni odzwierciedlają bogactwo materiału doświadczalnego zawartego w pracy.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma formę autoreferatu podsumowującego 5 prac wchodzących w cykl publikacyjny, opublikowanych w latach 2020 – 2023. Doktorant zaproponował mechanizm kowalencyjnej polimeryzacji badanych fenyloamin, a grubość wytwarzanych warstw oceniał na podstawie pomiarów metodą AFM. Rodzi się pytanie, na ile metoda XPS byłaby przydatna w badaniach osadzanych warstw? Pytanie ma charakter dyskusyjny i prosiłabym o rozwinięcie tego wątku podczas publicznej obrony pracy.

Podsumowując stwierdzam, że nie wnoszę zasadniczych uwag do interpretacji wyników i sposobu przeprowadzenia badań, które zostały przedstawione w opublikowanych pięciu pracach w wiodących czasopismach.

Wnioski końcowe

Doktorant zrealizował bardzo obszerny program badań eksperymentalnych, a uzyskane wyniki mają niepodważalne znamiona nowości naukowej. Praca stanowi cenny wkład w aspekty poznawcze dotyczące zagadnień z obszaru inżynierii chemicznej, zwłaszcza procesów polimeryzacji fenyloamin w kierunku wytwarzania hydrofilowych powłok polimerowych na powierzchniach różnych wyrobów medycznych. Doktorant wykazał, że możliwe jest wytworzenie pokryć z PDA o grubości ok. 60 nm w procesie prowadzonym tylko przez jedną godzinę. Wykazał również, że takie pokrycia zwiększają adhezję i proliferację różnych komórek. Doktorant opracował również metodę wytwarzania nowych pokryć poprzez oksydacyjną polimeryzację fenyloamin, tj. L-tyrozyny, L-fenyloalaniny oraz 2-fenyloetyloaminy.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Kandydat do stopnia doktora nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna jest współautorem pięciu artykułów opublikowanych w indeksowanych czasopismach, będąc pierwszym Autorem w czterech z nich. W dorobku Doktoranta znajduje się sumarycznie 7 publikacji, jeden rozdział w monografii, jeden patent i 10 wystąpień konferencyjnych.

Biorąc pod uwagę osiągnięte wyniki, stwierdzam iż przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Kamila Kopcia spełnia warunki przewidziane ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 187, Dz.U. z 2022 r., poz. 574, z późn.

zm.). Dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgra inż. Kamila Kopcia do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.

Ponadto, biorąc pod uwagę, że (i) recenzowana praca dostarcza nowych i wartościowych informacji na temat procesu osadzania pokryć z polifenyloamin na podłożach materiałów wykorzystywanych do produkcji wyrobów medycznych, (ii) wskazuje na możliwości praktycznego wykorzystania opracowanego nowego procesu do osadzania hydrofilowych warstw z polifenyloamin na protezach naczyń krwionośnych i porowatych rusztowań polimerowo-ceramicznych oraz (iii) udowadnia, że Doktorant porusza się ze swobodą w wykorzystaniu różnych narzędzi badawczych stosowanych nie tylko w inżynierii chemicznej, ale i w naukach biologicznych, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgra inż. Kamila Kopcia.



Szczecin, 21.09.2023 r.