



Wrocław, 04.08.2023 r.

Prof. dr hab. Rafał J. Wiglusz,
Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych
Polska Akademia Nauk
Oddziału Fizykochemii Biomedycznej
ul. Okólna2, 50-422 Wrocław
tel.: (+48) (071) 3954159
e-mail: R.Wiglusz@intibs.pl
web-page: <http://www.intibs.pl>

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Seweryn

pt. *„Otrzymywanie i badanie biomimetycznych, cienkich warstw tlenków metali przejściowych”* w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki fizyczne

Rozprawa doktorska została zrealizowana w Oddziale Fizyki Promieniowania i Spektroskopii Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk. Promotorem tej rozprawy jest prof. dr hab. Marek Godlewski.

Recenzję ww. rozprawy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pismo nr RN-64/2023 z dnia 31 maja 2023 przesłane przez prof. dr. hab. Tomasza Story, Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, zawierające informację o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Seweryn.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma postać formy hybrydowej tzn. połączenia monografii z cyklem prac, które zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym o wysokiej renomie wśród czasopism w obszarach nanomedycyny, nanobiotechnologii i nauki o materiałach (współczynnik oddziaływania czasopism w roku publikacji wynosi od 3,4 do 9,4) i liczącej 150 stron - formalnie 209, włączając w to trzy publikacje - łącznie z literaturą, materiałami dodatkowymi i rozdziałem opisującym osiągnięcia naukowe Doktorantki. W mojej ocenie takie podejście jest dość skomplikowaną formą prezentowania wyników pracy naukowej – szczególnie dla czytelnika, która wymusza konieczność przeczytania również w całości opublikowanych prac naukowych. Zaletą jest to, że pozawala na zapoznanie się z wynikami powiązаныmi z rozprawą doktorską oraz z osobistym nastawieniem Autora do swoich badań. Dzięki współpracy z renomowanymi ośrodkami badawczymi w Polsce oraz wsparciu merytorycznemu i dużemu doświadczeniu naukowemu Promotora, prof. dr. hab. Marka Godlewskiego, mogła uzyskać wiele wartościowych wyników o dużym potencjale

Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Institute of Low Temperature and Structure Research
im. Włodzimierza Trzebiatowskiego Polskiej Akademii Nauk Polish Academy of Sciences

• ul. Okólna 2, 50-422 Wrocław | Poland • tel. +48 71 343 5021 • intibs@intibs.pl • www.intibs.pl



aplikacyjnym. Doktorantka, mgr Aleksandra Seweryn, wyróżnia się dużą aktywnością naukową. Potwierdzeniem tego jest Jej współautorstwo w 10 publikacjach, 9 zgłoszeń patentowych oraz 6 wyróżnień na konferencjach i targach naukowych, w okresie 2019- 2023. Uważam osiągnięcia te za bardzo dobre, biorąc pod uwagę obecny etap kariery naukowej Doktorantki.

Problem badawczy

Tematyka badawcza podjęta przez mgr Aleksandrę Seweryn jest bardzo ważna i aktualna ze względu na to, że dotyczy medycyny regeneracyjnej. Inżynieria tkankowa stara się wyjść naprzeciw temu działowi medycyny, poszukując wciąż nowych rozwiązań związanych z regeneracją narządów i tkanek. Podstawowymi elementami, wykorzystywanymi w inżynierii tkankowej są biomateriały, komórki progenitorowe oraz cząsteczki bioaktywne. Elementy te tworzą tzw. triadę inżynierii tkankowej, warunkując proces regeneracji i przebudowy tkanek. Stworzenie biomateriałów, pełniących równocześnie rolę nośników komórek progenitorowych i substancji bioaktywnych jest istotne dla odbudowania funkcjonalnej tkanki i warunkuje efektywność terapeutyczną. Jest to szczególnie ważne w kontekście leczenia rozległych uszkodzeń tkanek, jak np. tkanki kostnej, wynikających z urazu, bądź resekcji kości zajętej przez nowotwór, czy urazy czaszkowo-mózgowe oraz uszkodzenia rdzenia kręgowego.

Główny problem badawczy pracy doktorskiej oparty jest na ocenie potencjału funkcjonalności powłoki HfO_2 , która została otrzymana z pomocą techniki ALD (*ang.* Atomic Layer Deposition) – osadzania warstw atomowych na różnych podłożach, opartej na sekwencyjnym zastosowaniu chemicznego osadzania się z faz gazowych substancji chemicznych zwanych prekursorami. Przygotowane powłoki na podłożach kwarcowych inkubowano w przygotowanych roztworach w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, a następnie przy pomocy metod fizykochemicznych badano czy na powierzchni obecne są struktury mineralne.

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne. Tytuł pracy jest zgodny z treścią w niej zawartej, a opisywane zagadnienia dotyczą aktualnych kierunków badań związanych z opracowaniem nowych cienkich warstw tlenku metalu przejściowego, który sprzyjałby formatowaniu fosforanów wapnia na powierzchni implantu. Niemniej jednak, mam pewne zastrzeżenia, co do użycia w tytule „biomimetyzm”. Zgodnie z definicją - za “Biomimetics – Bioinspired Hierarchical-Structured Surfaces for Green Science and Technology”, Book 2018, Bharat Bhushan – to naśladowanie modeli, systemów i elementów natury w celu



rozwiązywania złożonych problemów ludzkich, związane z badaniami i rozwojem systemów syntetycznych, które naśladują powstawanie, funkcję lub strukturę substancji i materiałów wytwarzanych biologicznie oraz mechanizmy i procesy biologiczne. W tym kontekście użycie tego słowa w tytule – nie do końca spełnia powyższe kryteria.

W pracy można wyróżnić dwanaście części, które stanowią główną część pracy doktorskiej, wraz z 47 rycinami i 13 tabelami. Osiem rozdziałów dysertacji ma charakter merytoryczny (Rozdział 1, Rozdział 2, Rozdział 3, Rozdział 4, Rozdział 5, Rozdział 6, Rozdział 7 i Podsumowanie), a cztery rozdziały charakter pomocniczy (Wstęp, Streszczenie, Dorobek naukowy autorki, Bibliografia oraz Załączone publikacje).

W pierwszej z nich, w tzw. Wstępie, zawierający trzy podrozdziały (tzw. Cel i przedmiot badań, Układ pracy oraz Lista skrótów (9 strony), to przedstawienie inspiracji, związanych rozwojem cywilizacji i chorobami cywilizacyjnymi, a także wprowadzenie do tematyki nanotechnologii i otrzymywania cienkich warstw – powłok HfO_2 – metodą ALD (ang. Atomic Layer Deposition), którą kończy opis metody fizykochemicznych wykorzystywanych przez Doktorantkę w czasie jej badań, jak również cel dysertacji. Do tej części mam kilka uwag. Po pierwsze, zabrakło opisu różnych metod wytwarzania – w porównania do metody ALD, jak i mechanizmów wzrostu cienkich warstw na różnych podłożach, które mogły posłużyć Doktorantce, aby zrozumieć i wytłumaczyć zjawiska zachodzące w otrzymanych materiałach. Natomiast, opis układu pracy, w tej części pracy, wydaje mi się zbędny i nic nie wnoszący.

Rozdział 1 (26 stron) pracy doktorskiej stanowi właściwy wstęp do dysertacji. Chociaż Autorka skupiła się głównie na opisie budowy tkanki kostnej i poszczególnych jej elementów oraz implantach kostnych. Przedstawiono również sposoby funkcjonalizacji powierzchni implantów jako metoda mająca na celu wsparcie procesów osteointegracyjnych. Dodatkowo, opisano problemy okołoperacyjne wynikające z wszczepienia ciała obcego w odniesieniu do badań naukowych, promujące zarówno ortopedyczne jak i ogólnoustrojowe kwestie zdrowotne. W końcu, opisano funkcjonalizację powierzchni implantologicznej tlenkami metali przejściowych, takimi jak tlenek cyrkonu (IV), czy tlenek tytanu (IV) metodą ALD oraz ich badania związane z właściwościami biologicznymi wykonane na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Badania te ukierunkowane były na wykazanie właściwości osteogennych przygotowanych warstw tlenkowych. W tej części Autorka powraca do opisu chorób cywilizacyjnych, w szczególności zmian osteoporotycznych tkanki kostnej u człowieka, które jest przyczynkiem do kolejnego opisu motywacji związanej z wyborem tematyki pracy doktorskiej. Niestety, ale w tej części



doktorantka nie uniknęła błędów, na które, z obowiązku recenzenta, chciałbym zwrócić uwagę. Przede wszystkim, chciałbym skupić uwagę na to, że każdy rozdział przedstawionej pracy zaczyna się od wstępu o nanotechnologii – co jest zbędę na kolejnych etapach pracy. Co więcej, moim zdaniem, Autorka zbyt dużo miejsca poświęca opisowi struktury i właściwości biologicznej tkanki kostnej, pomijając ważne aspekty otrzymywania cienkich warstwa tkankowych oraz związane z tym oddziaływań, czy zjawisk powierzchniowych oraz właściwości fizykochemicznych takich układów. Dodatkowo, Autorka jako skrót hydroksyapatytu podaje HA – co w najnowszej literaturze jest przypisywane kwasowi hialuronowemu (*ang.* Hialuronic acid), a dla wspomnianego hydroksyapatytu oznaczenie to jest HAp (*ang.* Hydroxyapatite). Poza tym, myli aniony CO_3^{2-} z tlenkiem węgla (IV) CO_2 , jak również jony fosforanowe (V) PO_4^{3-} z grupami PO_3^- .

Chciałbym również nadmienić, że tzw. apatyt biologiczny to związek występujący w kościach i zębach i który jest zanieczyszczoną formą hydroksyapatytu (HAp). Ogólny wzór chemiczny związków o strukturze apatyty można przedstawić jako $\text{M}_{10}(\text{TO}_4)_6\text{X}_2$, gdzie M to najczęściej jony metali na +2 stopniu utlenienia, typu Ca^{2+} . Stwarza to możliwość podstawienia ich przez inne jony, na przykład dwuwartościowe jony takie jak Mn^{2+} , Sr^{2+} , ale również jednowartościowe jony typu Na^+ , K^+ , Ag^+ , Rb^+ , oraz trójwartościowe jony metali ziem rzadkich. I tak wśród rodziny minerałów fosforanów wapnia, do których należą apatyty wymienić można najczęściej występujące: hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - HAp, fluoroapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ - FAp, chloroapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ - ClAp oraz apatyt węglanowy - CO_3Ap . Apatyt stechiometryczny krystalizuje w układzie jednoskośnym w grupie przestrzennej $P2_1/b$, natomiast tzw. niestechiometryczne związki o strukturze apatyty krystalizują w układzie heksagonalnym w grupie przestrzennej $P6_3/m$ (Handbook of Bioceramics and Biocomposites; Springer International Publishing, 2016; ISBN 978-3-319-12460).

Co więcej, Autorka używa sformułowań, które nie do końca są jasne lub są użyte w złym kontekście, takie jak: (i) remodelacja – wydaje mi się, że chodziło o regenerację tkanki kostnej, (ii) sieć krystalograficzna – chyba krystaliczna (np. jony PO_4^{3-} tworzą w strukturze ... sieć krystalograficzną – str. 21) - zresztą ten błąd pojawia się w całej pracy, (iii) pro-apatyto twórcze właściwości? Po pierwsze nie wszystkie związki fosforany wapnia mają strukturę hydroksyapatytu. Po drugie, przedrostek „pro-” w znaczeniu „za-” nie jest potrzebny.

Kolejny Rozdział 2 (25 stron) to opis materiałów i metod używanych podczas badań zwianych z pracą doktorską. Autorka skupiła się przede wszystkim na opisie otrzymywania tlenku hafnu (IV) metodą ALD i osadzania cienkich warstw tą metodą oraz opis tej metodologii zarówno teoretyczny, jak i praktyczny. W dalszej części Autorka skupiła się na opisie wykorzystania roztworu SBF (*ang.* Simulated Body Fluid) w badaniach *in vitro*. Dalej znajduje się opis oddziaływań promieni X z materiałą wraz z opisem aparaturowym. Przede wszystkim, chciałbym zwrócić uwagę,



że Autorka rozprawy doktorskiej przeskakuje w tym rozdziale z tematu na temat. Najpierw opisuje eksperyment z wykorzystaniem roztworu SBF – wydaje mi się, że tytuł podrozdziału powinien brzmieć „Badania bioaktywności i cytotoksyczności”, a później ponownie opisuje w podrozdziale 5.4.2. eksperyment z wykorzystaniem roztworów SBF. To trochę przeszkadza w czytaniu tego rozdziału. Co więcej, wzory i równania, opisujące zjawiska fizyczne w tym, jak i w pozostałych rozdziałach są nienumerowane. Nie daje to możliwości prześledzenia rozumowania Autorki związanego z ich zasadnością przedstawienia w rozprawie doktorskiej. Na przykład na str. 15 Autorka przedstawia równania energii związane z Rentgenowską spektrometrią fotoelektronów (*ang.* X-ray Photoelectron Spectroscopy), a następnie nagle pojawia się równanie opisujące głębokość wnikania wiązki w próbkę. Chyba czegoś zabrakło w tym opisie?

Rozdział 3 (8 stron) dotyczy eksperymentu związanego z optymalizacją wytwarzania powłok tlenku hafnu (IV) techniką ALD, gdzie starano się zastosować ozon - jako prekursor tlenu, w porównaniu do H₂O (para wodna) w warunkach laboratoryjnych. Do tego rozdziału nie mam większych uwag. Natomiast, zabrakło mi opisu eksperymentu związanego z otrzymywaniem pozostałych związków tlenków metali przejściowych. Poza tym, Autorka cały czas myli prekursor z ligandem – to są całkiem inne określenia chemiczne odnośnie do związków chemicznych.

Rozdział 4 (14 stron) dotyczy części eksperymentalnej oceny właściwości biologicznych otrzymanych warstw tlenku hafnu (IV) – jako materiału do pokrywania implantów kostnych – w symulowanych warunkach fizjologicznych – w roztworach SBF. W powyższym rozdziale pokazano, że na powłokach HfO₂ następuje osadzanie się związków fosforanów wapnia. W mojej ocenie zabrakło porównania właściwości biologicznych pozostałych warstw opartych o tlenki tytanu (IV) oraz cyrkonu(IV). Poza tym, tak jak już wspominałem wcześniej, nie wszystkie związki fosforanowe jonów wapnia – krystalizują w strukturze hydroksyapatytu. Z tego względu „Model biomineralizacji tkanki kostnej” (4.3.1.) – podjęty przez Autorkę – wydaje mi się zbędny, ponieważ procesy które zachodzą w organizmie żywym, tak bardzo odbiegają od tych symulowanych w laboratorium, że na tej podstawie jesteśmy w stanie tylko ocenić biokompatybilność i cytotoksyczność otrzymanych materiałów implantacyjnych.

Rozdział 5 (7 stron) przedstawia proces wysokotemperaturowej modyfikacji warstw tlenku hafnu (IV) metodą ALD. W tym rozdziale również zabrakło mi pokazania możliwości wysokotemperaturowej modyfikacji cienkich warstw tlenków tytanu(IV) i cyrkonu(IV). Poza tym, obliczenia wielkości kryształitów metodą Sherrer'a – dla cienkich warstw tlenkowych – wydają się być dużym uproszczeniem – nie oddającym rzeczywistych rozmiarów otrzymanych materiałów. Jest wiele innych metod zarówno obliczeniowych np. Metoda Rietveld'a, jak eksperymentalnych np. wysokorozdzielcza



transmisyjna mikroskopia elektronowa (*ang.* High-Resolution Transmission Electron Microscopy – HRTEM).

Rozdział 6 (20 stron) zawiera opis wyników wpływu wytworzonych w różnych temperaturach cienkich warstw tlenku hafnu (IV) na osadzanie się związków fosforanów wapnia z roztworów SBF. Autorka omawia to w kontekście odniesieniu do dostępnej literatury naukowej. Jest to jeden z najciekawszych i kluczowych wyników w perspektywie aplikacji takich materiałów w implantologii tkanek twardych, jakie zaprezentowała Autorka w dysertacji. W tym rozdziale również zabrakło szerszego spojrzenia biomedycznego na materiały cienkowarstwowe tlenków metali przejściowych, które mogłyby zwiększyć możliwości ich zastosowania, zwłaszcza w odniesieniu do tlenku cyrkonu (IV) w implantologii. Co więcej, Autorka nie omawia wpływu bufora (TRIS - tris(hydroksymetylo)aminometanu – kwas solny) na tworzenie się związków fosforanu wapnia na powłokach tlenku hafnu(IV), co ma bardzo ważny wpływ na krystalizację związków fosforanowych.

Rozdział 7 (2 strony) to opis przyszłych planów naukowych Autorki, w których są przedstawione przyszłe badania związane z biomateriałami – które mogłyby być zastosowane w medycynie regeneracyjnej. Autorka chciałaby badać mechanizmy oddziaływań fizykochemicznych i biologicznych takich biomateriałów. To dobra perspektywa – szkoda, że nie udało się tego, chociaż w części zrealizować w tej rozprawie doktorskiej. W opisie, zauważalny jest brak perspektywy użycia innych technik fizykochemicznych w badaniach biomateriałów – zwłaszcza w perspektywie ich aplikacji. Z drugiej strony rozumiem, że w czasie studiów doktoranckich nie wszystko udaje się przebadać – co się zaplanowało.

Ostatni rozdział związany z charakterem merytorycznym dysertacji „Podsumowanie” (2 strony) to rekapitulacja tego, co udało się osiągnąć Doktorantce w czasie pracy nad badaniami układów cienkich warstw tlenkowych metali przejściowych.

Pozostałe rozdziały uzupełniające to „Dorobek naukowy autorki” (7 stron), „Bibliografia” (24 strony), gdzie Autorka cytuje 202 publikacje naukowe związane z przedstawioną dysertacją oraz „Załączone publikacje” (3 publikacje – 51 stron) dotyczące badań biologicznych tlenków tytanu(IV), cyrkonu(IV) oraz hafnu(IV).

W pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandrze Seweryn, nie udało się uniknąć błędów – również edycyjnych oraz interpunkcyjnych – o których wcześniej nie pisałem, ponieważ skupiłem się na ocenie merytorycznej pracy. Mimo to, stwierdzam, że mgr Aleksandra Seweryn w ramach pracy doktorskiej uzyskała wiele bardzo wartościowych wyników o dużym potencjale aplikacyjnym związanych z różnymi modyfikacjami cienkich warstw na bazie tlenku hafnu(IV) i ich aktywności biologicznej. Na podstawie przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej jestem



przekonany o dojrzałości naukowej Doktorantki i jej bardzo dobrej znajomości aktualnego stanu wiedzy w obszarze prowadzonych badań, jak też krytycznemu spojrzeniu na uzyskane przez Nią wyniki w kontekście innych danych literaturowych, jak też możliwości ich praktycznego wykorzystania.

Wnioski końcowe

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Seweryn spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-4 Ustawy *Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) ze względu na: (i) aktualny i ważny problem naukowy związany z projektowaniem i otrzymywaniem biomateriałów do zastosowań w implantologii tkanki kostnej, (ii) dostarczenie nowej wiedzy dotyczącej otrzymywania i modyfikacji cienkich warstw tlenku hafnu(IV) metodą ALD, (iii) ocena właściwości biologicznych otrzymanych cienkich warstw tlenków metali przejściowych otrzymanych metodą ALD.

Co więcej, jestem przekonany, że Doktorantka udowodniła, że jest przygotowana do rozwiązywania zadań badawczych i w pełni opanowała warsztat badawczy, niezbędny do rozwiązywania problemów w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki fizyczne. W związku z powyższym, składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Seweryn do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Rafał J. Wigłusz

Instytut Niskich Temperatur
i Badań Strukturalnych
im. Włodzimierza Trzebiatowskiego
Polskiej Akademii Nauk
50-422 Wrocław, ul. Okólna 2
tel. 071 3435021, fax 071 3441029, NIP: 896-00-07-258