



dr hab. Magdalena Bieda-Niemiec, prof. instytutu

Kraków, 10.12.2024

Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej

Polskiej Akademii Nauk

ul. Reymonta 25, 30-059 Kraków

tel.: +48 (12) 295 28 06

e-mail: m.bieda@imim.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Diany Clemencii Martinez Guerrero
pt. „Mg-based Bioabsorbable Implants: From Surface Characterization
to Tissue-implant Interface Evaluation After *in vitro* and *in vivo* Degradation”
wykonana na zlecenie Rady Naukowej dyscypliny Inżynieria Materiałowa
Politechniki Warszawskiej na podstawie uchwały z dnia 25 października 2024 r.**

1. Uwagi ogólne

Materiały bioabsorbowalne w tym metale bioabsorbowalne (magnez, żelazo, cynk, molibden) cieszą się w ostatnich latach dużym zainteresowaniem w kontekście ich zastosowania na implanty czasowe, które po spełnieniu swej roli leczenia i podtrzymywania uszkodzonej tkanki ulegają rozpuszczeniu w organizmie żywym, a produkty ich rozpuszczania nie są szkodliwe. Największa ilość badań koncentruje się nad stopami magnezu i chociaż istnieje już kilka wdrożonych rozwiązań komercyjnych, ciągle wiele pytań i problemów pozostaje do rozwiązania w celu szerszego wykorzystania tych materiałów.

Przedstawiona do recenzji praca zajmuje się jednym z bardzo istotnych problemów związanych z badaniami korozji stopów bioabsorbowalnych w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Jest to problem bardzo złożony, gdyż w przypadku zastosowania tych materiałów, musi być spełnione równocześnie wiele warunków. Szybkość korozji musi być na odpowiednim poziomie, korozja musi zachodzić równomiernie, ale także produkty korozji muszą być nieszkodliwe dla organizmu. Wiele

badania w literaturze koncentruje się na pojedynczych wybranych aspektach, wykorzystując głównie badania *in vitro*. Często przełożenie badań *in vitro* na badania *in vivo* a następnie badania kliniczne jest trudne ze względu na skomplikowanie opisu układu organizmów żywych i ilość parametrów, które trzeba uwzględnić analizując wyniki. Rozprawa doktorska koncentruje się na kilku kluczowych aspektach tych zagadnień tj. prowadzenie badań *in vitro* w warunkach bardziej zbliżonych do realnych wykorzystując kokultury komórek i wykazanie że warstwa korozyjna wytwarzana na materiałach na osnowie magnezu jest zależna od interakcji pomiędzy komórkami a implantem magnezowym, a także analiza warstwy korozyjnej na różnych materiałach na bazie magnezu w warunkach *in vivo*, w tym jej składu i grubości, co ma bezpośrednie przełożenie na jednorodność i szybkość korozji tych materiałów.

Tematyka prowadzonych badań jest więc bardzo aktualna i stanowi nowatorskie podejście do problemu wykorzystując różne techniki obrazowania i analizy min. SEM, FIB/SEM/EDS, XPS, μ CT w celu określenia składu i struktury produktów korozji, topografii i właściwości interfejsu kość-implant zarówno po badaniach *in-vitro* jak i *in-vivo*.

2. Charakterystyka rozprawy i edycyjne aspekty pracy.

Otrzymana do recenzji rozprawa doktorska składa się z 8 rozdziałów wraz ze Streszczeniem w j. polskim i angielskim, Spisem treści, Listą skrótów i symboli, Literaturą, Podziękowaniami, Życiorysem oraz Listą rysunków i Tabel i liczy 370 stron. Posiada 584 pozycje literaturowe, głównie z ostatnich 10 lat. Wszystkie części są napisane w j. angielskim. Rozdział 1 stanowi obszerny 42 stronicowy wstęp, wprowadzający do zagadnień związanych ze stopami magnezu w szczególności w kierunku ich zastosowań na implanty w tym implanty kostne. Ta część rozprawy oparta jest o najnowszą literaturę światową w tym zakresie (obejmuje ponad 180 pozycji literaturowych). Jest napisana poprawnym językiem, występują drobne uchybienia edytorskie jak np. niekonsekwencja w nazewnictwie w tabeli 1.3, czy błędy w odniesieniu do numeracji rysunków str. 56, oraz liczby dni i tygodni po implantacji. Rozdział 2 w swoim założeniu ma opisywać cele, hipotezę badawczą i zakres pracy. Został jednak poszerzony o podrozdziały opisujące materiały i metody badawcza, a następnie przegląd rezultatów badań. Na zakończenie podana jest lista publikacja, które wchodzi w skład pracy jednak w innej kolejności niż są następnie przedstawione w dalszych rozdziałach. Rozdział ten byłby bardziej przejrzysty gdyby został podzielony na dwa osobne rozdziały dotyczące celu i zakresu pracy oraz materiałów i metod badawczych, a krótkie podsumowania rozdziałów zostałyby od razu powiązane z publikacjami. Równocześnie kluczowe osiągnięcia pracy powinny raczej znaleźć się w rozdziale 8 jako podsumowanie i wnioski. Istotną informacją w tym rozdziale jest też to, że praca realizowana była w ramach projektu europejskiego MgSafe finansowanego z programu

Horyzont 2020 Program *Marie Skłodowska-Curie Actions* – MSCA co pozwoliło na współpracę 15 doktorantów z 12 różnych instytucji z 8 krajów europejskich. Zasadnicza treść kolejnych pięciu rozdziałów oparta jest na publikacjach, z których cztery są już opublikowane i jedna złożona do czasopisma i jest w trakcie recenzji. Należy podkreślić, że są to publikacje w uznanych czasopismach o szerokim zasięgu jak np. *Bioactive Materials* (200 pkt, IF 18), *Acta Biomaterialia* (140 pkt, IF 9,4), *Biomaterials Advances* (dawniej *Materials Science and Engineering: C*). W dwóch z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Wszystkie publikacje są jednak wieloautorskie. W tej części należałoby mocniej podkreślić wkład doktorantki w realizację poszczególnych prac. Wkład doktorantki jest opisany oczywiście w samych publikacjach jednak na dużym poziomie ogólności. Ze względu na charakter pracy zrozumiałe jest, że praca mogła osiągnąć dobre rezultaty tylko i wyłącznie realizowana w dużym interdyscyplinarnym zespole w tym przypadku dodatkowo międzynarodowym. Z punktu widzenia recenzenta kluczowy jest jednak dokładny zakres prac realizowanych przez Doktorantkę. Bardzo dobrym rozwiązaniem jest przedstawienie na końcu każdego rozdziału składającego się z publikacji, krótkiego powiązania z następnym rozdziałem (artykułem).

Taka konstrukcja rozprawy doktorskiej jest trudniejsza do logicznego przedstawienia, jednak mimo drobnych uchybień autorka włożyła dużo pracy w odpowiednie pokazanie najważniejszych rezultatów realizowanych badań i uwypuklenie osiągnięć wynikających z poszczególnych publikacji wiążąc je w całość. Drobne uchybienia edycyjne nie przeszkadzają w zrozumieniu celów i założeń pracy oraz przedstawieniu dowodów ich realizacji w postaci publikacji w renomowanych czasopismach.

3. Ocena pracy pod względem merytorycznym

Pani Diana Martinez we wstępie do swojej pracy przedstawia uzasadnienie podjęcia się tematyki badawczej, która uważana jest za szczególnie ważną w dobie zwiększania nakładów na zdrowie i opiekę medyczną w celu poprawy komfortu życia szczególnie w starzejących się społeczeństwach krajów wysoko rozwiniętych. Te ważne zagadnienia wymagają rozwiązań uzyskanych we współpracy z pogranicza medycyny i inżynierii.

W pracy zostały postawione dwie hipotezy badawcze. Pierwsza dotyczy wpływu obecności, proliferacji i adhezji komórek na skład warstwy korozyjnej na materiałach na bazie magnezu w warunkach *in vitro*. Druga hipoteza mówi, że skład warstw korozyjnych na implantach różni się w zależności od ich lokalizacji *in-vivo*. Na podstawie tych postawionych hipotez sformułowano trzy cele badawcze. Pierwszym celem pracy było dostarczenie podstawowych informacji o badanych implantach na bazie magnezu. Drugim celem pracy było określenie szybkości korozji implantów na

bazie magnezu bez i z obecnością komórek osteoblastów i osteoklastów oraz analiza zmian kinetycznych w składzie produktów degradacji w miarę postępu korozji materiału magnezowego. Trzecim postawionym celem było scharakteryzowanie interfejsu tkanka-warstwa korozyjna-implant Mg przy użyciu badań *in vivo*, aby ocenić zachowanie korozyjne w różnych obszarach tkankowych. Opisane hipotezy badawcze i założone cele można uprościć do nadrzędnego celu jakim jest „uzyskanie wiedzy o mechanizmach korozyjnych zachodzących podczas degradacji implantów na bazie magnezu”. Ten cel wydaje się najważniejszy i najlepiej spajający całość pracy.

Do badań wybrano aż cztery materiały na bazie magnezu, czysty magnez (Mg ~99,998 % wag.), ultra czysty magnez (Mg>99,999 % wag.) i stopy Mg-Zn-Ca (Z100) oraz MgYREZr (WE43). Badano materiały wytworzone w kształcie dysków, trzpieni i śruby. Jest to dość szeroki zakres badawczy, szczególnie do porównania otrzymanych wyników.

Doktorantka realizację postawionych celów przedstawiła przy użyciu zbioru pięciu publikacji przedstawionych w kolejnych rozdziałach. W rozdziale 3, który przedstawia pierwszą publikację przedstawione zostały wyniki dotyczące badań *in vitro* wpływu komórek osteoblastów i osteoklastów na skład warstwy korozyjnej na dwóch materiałach: czystym magnezie (99,998) i stopie WE 43 (MgYREZr). Przedstawiono wyniki korozji elektrochemicznej a także charakterystykę produktów korozyjnych przy użyciu metody FIB/SEM/EDS co pozwoliło na lokalną analizę warstwy korozyjnej. Głównym wnioskiem płynącym z publikacji jest zaobserwowanie różnic w sformowanej warstwie korozyjnej w zależności od użytych komórek lub ich kombinacji. Jest to istotne z punktu widzenia przybliżenia warunków badań *in-vitro* do skomplikowanego środowiska dynamicznego badań *in vivo* w celu możliwości ograniczenia badań na zwierzętach. Na chwilę obecną badania *in vivo* to jednak ciągle jedyna możliwość zobaczenia co dzieje się w trakcie procesów korozyjnych materiałów na bazie magnezu. Kolejne przedstawione wyniki skupiają się na badaniach *in vivo* w celu zobrazowania procesów zachodzących na styku kość implant. W drugiej publikacji badania dotyczyły stopu magnezu WE43 zawierającego metale ziem rzadkich. W badaniach porównano w warunkach *in vivo* wpływ implantacji w kości udowej szczurów stopu magnezu ze stopem na bazie tytanu z dodatkowym zastosowaniem biomarkerów. Jednym z najważniejszych obserwacji w ramach tej pracy było znalezienie itru i metali ziem rzadkich REE w organach (śledziona, wątroba, nerki) oddalonych od miejsca implantacji po 90 dniach od implantacji stopu WE43. Należy podkreślić, że jest to stop od 2012 r dopuszczony do użycia w ortopedii. Wykorzystano badania SEM/EDX do analizy interfejsu kość-implant, co pozwoliło zaobserwować zmiany szerokości i składu warstwy korozyjnej.

Następny artykuł przedstawia badania *in vitro* i *in vivo* śrub ortopedycznych ze stopu ZX00. W ocenie recenzenta jest to jedno z najciekawszych osiągnięć pracy pokazujących jak kluczowe jest

zbadanie mikrostruktury materiału po procesie technologicznym w kontekście projektowania jego właściwości zarówno mechanicznych jak i korozyjnych. Kontrolowanie wielkości ziarna czy rozkładu wydzielen jest istotne ze względu na ich wpływ na jednorodność procesu degradacji i utrzymanie integralności mechanicznej.

W czwartym artykule przedstawiono procesy korozji czystego magnezu *in vivo* i *in vitro* w odniesieniu do stopu na bazie tytanu w kontekście identyfikacji powstawania stanu zapalnego. Ostatni artykuł dotyczy porównania procesu degradacji implantów wytworzonych z ultra czystego magnezu i stopu ZX00 z cynkiem i wapniem również wyprodukowanego na bazie ultraczystego magnezu. Umożliwiło to zaobserwowanie wpływu wyłącznie tych dwóch pierwiastków stopowych jako alternatyw dla stopów zawierających pierwiastki ziem rzadkich REE. Wykazano pozytywny wpływ stopowania cynkiem i wapniem na szybkość degradacji magnezu.

W kończącym rozprawę rozdziale 8 przedstawiono 5 wniosków, krótkie podsumowanie oraz zagadnienia na przyszłość. Brakuje w tym rozdziale podsumowania, które zostało częściowo przedstawione w rozdziale 2.

Po zaznajomieniu się z pracą nasuwają się natomiast następujące uwagi i pytania:

- 1) W pracy przedstawiono dość szeroką gamę materiałów i parametrów. Pokazano kluczowe aspekty, które mogą wpływać na mechanizmy korozji materiałów na bazie magnezu. Istotne byłoby skupienie się na jednym parametrze i zobrazowanie jego wpływu na właściwości mechaniczne, korozyjne i biologiczne materiału na bazie magnezu przeznaczonego na implanty kostne.
- 2) Na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* i *in vivo* czy można sformułować zalecenia do prowadzenia badań *in vitro* w celu uzyskania kluczowych informacji. Jakie najważniejsze informacje dla stopów magnezu dostarczają badania *in vitro* ?
- 3) Rys. S6.2 przedstawia porównanie mikrostruktury Mg i Ti. Jakie znaczenie w tym przypadku miały znaczne różnice w mikrostrukturze dla wyników prowadzonych badań?
- 4) Szeroko rozważaną metodą eliminacji procesów uwalniania się wodoru w początkowej fazie po implantacji jest stosowanie powłok, czy Doktorantka widzi możliwość zastosowania materiału na bazie magnezu bez takich powłok? Z drugiej strony jak powłoka będzie wpływać na rozważaną interakcję kość-implant ? Co będzie kluczowym parametrem ?

Pytania te mają charakter polemiczny natomiast nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej pracy i jej wkładu w wyjaśnienie zachowania się materiału wyprodukowanego przez człowieka w kontakcie z naturalnym środowiskiem biologicznym organizmu. Daje to możliwości lepszego

projektowania przyszłych materiałów do zastosowań na implanty jak i samych implantów, aby zapewnić ich lepszą skuteczność i niezawodność.

4. Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi wartościowe opracowanie dotyczące korozji stopów magnezu z przeznaczeniem na implanty kostne w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Praca ma charakter nowatorski a uzyskane wyniki przyczynią się do lepszego zrozumienia zachodzących zjawisk w celu opracowania i wdrożenia nowych zoptymalizowanych biodegradowalnych implantów na bazie stopów magnezu. Doktorantka udowodniła, że posiada dużą wiedzę z zakresu inżynierii materiałowej oraz interdyscyplinarną wiedzę z pogranicza medycyny i biologii. Rezultaty i analiza wyników przeszły dodatkową weryfikację w postaci publikacji w czasopismach wysoko punktowanych, o dużych wskaźnikach wpływu i są już cytowane co dowodzi umiejętności planowania i prowadzenia pracy naukowej w szerokim zakresie badań interdyscyplinarnych w dużych zespołach badawczych.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki określonej w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (z późn.zm.) i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria materiałowa.

Równocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionej rozprawy obejmujący publikacje w czasopismach najwyżej punktowanych z wysokim wskaźnikiem wpływu, a także interdyscyplinarny charakter prac o ogromnym znaczeniu aplikacyjnym wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy.



Magdalena Bieda-Niemiec