



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII FARMACEUTYCZNEJ I BIOMATERIAŁÓW

Warszawa, 4.12.2024

Prof. dr hab. Joanna Kolmas
Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Diany C. Martinez G. pt. „Mg-based bioabsorbable implants: from surface characterization to tissueimplant interface evaluation after in vitro and in vivo degradation”.

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Zastępczyni Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa prof. dr hab. inż. Anny Boczkowskiej z dnia 31.10.24 r. powołującej mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Diany Clemencii Martinez Guerrero.

Wstęp:

Praca doktorska pani mgr Martinez została wykonana pod opieką promotora prof. dr hab. Wojciecha Świąszkowskiego oraz promotora pomocniczego dr Tomasza Płocińskiego na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej. Rozprawa przygotowana przez Doktorantkę stanowi część europejskiego projektu MgSafe finansowanego w ramach działań MSCA Horizon2020.

Oceniana dysertacja stanowi cykl następujących publikacji oryginalnych, opublikowanych w latach 2023-2024:

1. Martinez, D.C.; Borkam-Schuster, A.; Helmholz, H.; Dobkowska, A.; Luthringer-Feyerabend, B.; Plocinski T.; Willumeit-Romer, R.; Swieszkowski, W. (2024) Bone cells influence the degradation interface of



WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY
WUM

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 784
analityczna@wum.edu.pl

- Mg-based materials: insights from multimodal in vitro analysis. *Acta Biomater.* <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2024.08.015>
2. Martinez, D.C.; Dobkowska, A.; Marek, R.; Cwieka, H.; Jaroszewicz, J.; Płociński, T.; Donik, C.; Helmholz, H.; Luthringer-Feyerabend, B.; Zeller-Plumhoff, B.; Willumeit-Römer, B.; Swieszkowski, W. (2023). In vitro and in vivo degradation behavior of Mg-0.45Zn-0.45Ca (ZX100) screws for orthopedics applications. *Bioactive Materials* 28, 132-154. <https://doi.org/10.1017/j.bioactmat.2023.05.004>
 3. Ben, H.; Martinez, D.C.; Shah, F.A.; Johansson, A.; Emanuelsson, L.; Norlindh, B.; Willumeit, R.; Plocinski, T.; Swieszkowski, W.; Palmquist, A.; Omar, O.; Thomsen, P. (2023). Magnesium implant degradation provides immunomodulatory and proangiogenic effects and attenuates peri-implant fibrosis in soft tissues. *Bioactive Materials*, 26,353-369. <https://doi.org/10/1016./j.bioactmat.2023.02.014>.
 4. Okutan, B.; Schwarze, U.Y.; Berger, L.; Martinez, D.C.; Herber, V.; Suljevic, O.; Plocinski, T.; Swieszkowski, W.; Santos, S.G.; Schindl, R.; Loffler, J.F.; Weinberg, A.M., Sommer, N.G. (2023). The combined effect of zinc and calcium on the biodegradation of ultra-high-purity magnesium implants. *Biomater Adv.* 146,213-287. Doi:10.1016/j.bioadv.2023.213287.

oraz publikacji w trakcie recenzji (w *Journal of Tissue Engineering*):

5. Mota-Silva, E.; Martinez, D.C.; Basta, G.; Babonni, S.; del Turco, S.; Fragnito, D.; Salvatore, S.; Kusmic, C.; Leon, R.; Panetta, D.; Campanella, B.; Onor, M.; Plocinski, T.; Swieszkowski, W.; Menichetti, L. Monitoring osseointegration and degradation of Mg-alloy implants through plasma biomarkers of inflammation and bone regeneration.

Łączna punktacja załączonych publikacji (zgodna z obowiązującym wykazem czasopism MNiSW) wynosi 580, a współczynnik IF - 53.3. Każda publikacja jest wieloautorska i wielośrodkowa, co jest w pełni uzasadnione biorąc pod uwagę szeroki zakres przeprowadzonych badań. W dwóch artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem. Jednak w związku z brakiem oświadczeń autorów o udziale w pracach badawczych i powstaniu publikacji trudno jest jednoznacznie wskazać rolę Doktorantki i wykazać jej wiodący udział. Mam nadzieję, że Doktorantka przedstawi zakres swoich badań podczas publicznej obrony.

Rozprawa doktorska napisana jest w języku angielskim i zawiera: streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wprowadzenie w tematykę rozprawy (rozdział 1), cele, hipotezy badawcze i zakres badań (rozdział 2), opis i wyniki wykonanych badań (rozdziały 3-7), podsumowanie i perspektywę

planowanych badań (rozdział 8) oraz spis literatury, podziękowania, CV Doktorantki, spis rysunków i tabel zawartych w rozprawie.

Ocena wartości naukowej

Doktorantka w swojej rozprawie zajęła się tematem magnezu i jego stopów, które, podobnie do metali standardowo stosowanych jako implanty do stabilizacji złamań kości (tytanu i jego stopów, stopów kobaltu), charakteryzują się dobrymi właściwościami mechanicznymi. Jednak magnez w ludzkim organizmie ulega degradacji, należy więc do tzw. metali biodegradowalnych.

Implanty z magnezu i jego stopów zyskują w ostatnim czasie na znaczeniu, co związane jest właśnie z ich stopniową degradacją, a w efekcie brakiem konieczności ponownej operacji chirurgicznej i usuwania implantu po zagojeniu się złamania.

Szybkie tempo korozji magnezu w środowisku fizjologicznym może jednak naruszyć integralność mechaniczną takiego implantu jeszcze przed całkowitym wygojeniem się tkanki kostnej, co oczywiście stawia pod znakiem zapytania celowość tak zaplanowanego zabiegu. Jednocześnie, mimo wielu prowadzonych badań nad wpływem implantu Mg na tkankę kostną w warunkach *in vivo*, produktami korozji a także budowy interfejsu implant/nowo tworzona tkanka kostna, nadal nie ma pełnej wiedzy na temat krótko- i długotrwałych efektów Mg i jego stopów na organizm ludzki, w szczególności tkankę kostną i proces jej gojenia.

Dlatego cel, który obrała sobie Doktorantka i który brzmi „zebranie kompleksowych informacji na temat zachowania się Mg i jego stopów w trakcie implantacji przy użyciu technik obrazowania o wysokiej rozdzielczości, poznanie składu i struktury produktów korozji, topografii i właściwości interfejsu kość-implant i uzyskanie wiedzy o mechanizmach korozyjnych zachodzących podczas degradacji implantów na bazie Mg” wydaje się uzasadniony.

Doktorantka w dwóch pierwszych rozdziałach zwięźle wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy, ze szczególnym uwzględnieniem przedstawienia dotychczasowego stanu wiedzy na temat zastosowania magnezu oraz jego stopów jako materiałów do implantacji. Spis zacytowanej literatury w tym fragmencie dysertacji jest imponujący (ponad 200 odnośników), a selekcja informacji wystarczająca, by zaprezentować ogólny zarys wiedzy o podjętym temacie.

Część doświadczalną stanowią, jak już wspomniałam, rozdziały 3-7 (a właściwie 4 opublikowane artykuły i jeden manuskrypt w recenzji). W pierwszym artykule (rozdział 3) Doktorantka badała degradację czystego magnezu oraz stopu WE43 w kontakcie z osteoblastami (OB.) i osteoklastami (OC) w warunkach *in vitro*. Badania pokazały, że przyleganie komórek do powierzchni metali miało wpływ na proces degradacji: kokultury OB i OC opóźniały ten proces w przypadku stopów WE43. Co więcej, zaobserwowano w warstwie korozyjnej obecność m.in.



wapnia i fosforu korzystnie wpływających na procesy regeneracyjne tkanki kostnej. Doktorantka dokonała prawidłowej analizy uzyskanych wyników, krytycznie podchodząc do wyciąganych wniosków, czego efektem jest kontynuacja rozpoczętych badań w modelach zwierzęcych w warunkach *in vivo*. W rozdziale 4 Doktorantka badała długotrwały wpływ stopu WE43 wszczepionego do kości udowej szczurów. W tym celu przeanalizowała m.in. 16 biomarkerów zapalenia i regeneracji tkanki kostnej w osoczu. Interesowała ją także zawartość itru i innych pierwiastków ziem rzadkich (będących składnikami stopu WE43) w wątrobie, śledzionie oraz nerkach. Badania wskazały, że regeneracja tkanki kostnej wokół wszczepu WE43 jest opóźniona w porównaniu ze szczepem standardowym Ti, co spowodowane było wydzielaniem wodoru, natomiast nawet w 180 dniu badania obserwowano podwyższone poziomy czynniki VEGF, OPG czy G-CFS, co świadczyło o trwającym procesie regeneracyjnym i tworzeniu nowej tkanki kostnej. Implanty z WE43 charakteryzowały się silną osteointegracją. Jednak okazało się także, że itr oraz inne pierwiastki ziem rzadkich kumulowały się w badanych tkankach miękkich. Doktorantka przeprowadziła odpowiednią analizę otrzymanych wyników i porównała je z danymi literaturowymi. W związku z niebezpieczeństwem kumulacji pierwiastków ziem rzadkich zdecydowała o wybraniu innych stopów magnezu, jednocześnie zmieniając model zwierzęcy. W rozdziale 5 Doktorantka przedstawiła wyniki badania stopu Mg-045Zn-045Ca w warunkach *in vitro* (test 28-dniowy) oraz *in vivo* (do 24 tygodni). Ze stopu przygotowano śruby mocujące, które badano pod kątem korozji i degradacji. Testy *in vivo* wykazały, że zaproponowany w pracy stop magnezu wspomagał gojenie i tworzenie nowej tkanki kostnej. W teście *in vivo* i *in vitro* zaobserwowano ten sam skład pierwiastkowy warstwy korozyjnej, jednak inną jej grubość i rozkład pierwiastków w jej obrębie. Co ciekawe ustalono, że mikrostruktura powierzchni śruby ma kluczowy wpływ na szybkość procesu korozji, co jest istotną informacją na etapie produkcji materiału implantacyjnego.

Rozdział 6 poświęcony jest badaniu wpływu implantacji magnezu na tkanki miękkie. W badaniu wszczepienia podskórnego krążków magnezu szczurom początkowa intensywna degradacja Mg i wytworzenie Mg^{2+} wywołała silną odpowiedź zapalną, jednak po wytworzeniu warstwy korozyjnej (w której obecne były także jony wapnia i fosforu) i zahamowaniu procesu degradacji nastąpił proces regeneracji tkanki.

W rozdziale 7 Doktorantka badała na modelu zwierzęcym wpływ obecności zanieczyszczenia stopu (obecności wapnia oraz cynku) na proces biodegradacji w warunkach *in vivo*. Materiałem porównawczym był tytan. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów jednoznacznie wskazały, że zarówno czysty magnez jak i jego stop z wapniem oraz cynkiem charakteryzują się lepszą osteointegracją i silniej stymulują tworzenie tkanki kostnej wokół implantu niż Ti. Dodatek wapnia oraz cynku wpłynął korzystnie na spowolnienie procesu biodegradacji materiału i wydzielania wodoru, tym samym stanowiąc



obiecujące rozwiązanie w kontekście długotrwałej regeneracji tkanki kostnej i bezpieczeństwa stosowania.

Rozdział 8 stanowi zwięzłe (w punktach) podsumowanie przeprowadzonych eksperymentów. Doktorantka odnosi się w nim do postawionych celów i hipotez badawczych, które potwierdza, a także wskazuje potencjalne kierunki przyszłych badań.

Oceniając rozprawę doktorską mgr Diany C. Martinez G. stwierdzam, że Doktorantka wykazała się a umiejętnościami prowadzenia szerokich i interdyscyplinarnych prac eksperymentalnych, wyciągania wniosków z przeprowadzonych badań a także krytycznej dyskusji naukowej. Praca jest bardzo bogata w szereg wyników uzyskanych wieloma badaniami fizykochemicznymi i szczegółowymi testami biologicznymi prowadzonymi w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Przedstawiony zakres badań i zastosowane narzędzia i metody badawcze doprowadziły Doktorantkę do realizacji celu i potwierdzenia hipotez badawczych. Doktorantka w swoich badaniach wykazała się umiejętnością pracy w wieloosrodkowym interdyscyplinarnym zespole, co bardzo dobrze rokuje na Jej przyszłą pracę naukową.

Na uwagę zasługuje możliwość zastosowania otrzymanych wyników, szczególnie że Doktorantka bazowała na stopach magnezu komercyjnie dostępnych.

Praca zawiera szereg bardzo ciekawych, oryginalnych wyników, do najważniejszych moim zdaniem należą:

1. Monokultury i kokultury komórkowe OB i OC wpływają w różny sposób na skład warstwy korozyjnej stopów Mg i czystego Mg.
2. Odporność na korozję stopów Mg zależna jest od mikrostruktury.
3. Pierwiastki ziem rzadkich kumulują się w wątrobie, śledzionie i nerkach.
4. Mg i stopy Mg charakteryzowały się lepszą osteointegracją niż wszczepy z Ti.

Po wnikliwym zapoznaniu się z przedstawioną przez Doktorantkę pracą doktorską rodzą się pytania, które pozwolę sobie przedstawić i poprosić o przedyskutowanie w trakcie publicznej obrony:

1. Dlaczego wpływ na tkanki miękkie (artykuł zaprezentowany jako rozdział 6) został zbadany wyłącznie na czystym Mg? Czy Doktorantka nie powinna wykorzystać także stopu zawierającego cynk oraz wapń?
2. Czy Doktorantka w innych swoich badaniach zgłębiała zależność degradacji stopów magnezu i mikrostruktury powierzchni? Jak wyniki uzyskane przez Doktorantkę mogą wpłynąć na proces produkcji materiałów implantacyjnych (np. śrub).
3. Z czego wynikały rozbieżności w składzie stopu WE43 w pracy z rozdziału 3 (Tabela S3.1). Czy skład mógł wpływać na uzyskane wyniki?
4. Rozumiem powód rezygnacji z dalszych badań nad stopem zawierającym pierwiastki ziem rzadkich. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego Doktorantka wybrała stop zawierający cynk i wapń (w opisanych ilościach)?



5. Czy zdaniem Doktorantki proces degradacji magnezu i jego stopów można byłoby kontrolować przez warstwy bioceramiki? Jakich wyników można byłoby się spodziewać?
6. Czy zdaniem Doktorantki byłoby możliwe ograniczenie badań w warunkach in vivo przy jednoczesnym uzyskaniu wiarygodnych wyników biologicznych?

Oceniając dysertację od strony edycyjnej chciałabym podkreślić, że praca została przygotowana w sposób niezwykle staranny, z dużą dbałością o szatę graficzną. Liczne ryciny przygotowane samodzielnie przez Doktorantkę zdecydowanie ułatwiają przyswajanie treści rozprawy. Błędy literowe zdarzają się niezwykle rzadko, a cała praca napisana jest poprawnym, zrozumiałym językiem. Warto zwrócić uwagę, że przedrukowując ryciny z artykułów innych autorów powinno się zamieścić informację o uzyskaniu zgody na ich wykorzystanie.

Podsumowując ocenę podkreślam, że moje uwagi i postawione pytania nie obniżają wysokiej oceny rozprawy, której wyniki oprócz wartości poznawczej mają charakter aplikacyjny.

Zatem jednoznacznie stwierdzam, że recenzowana przeze mnie praca mgr Diany C. Martinez G. spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dn. 20 lipca 2018 roku (Dz.U. 2022 poz. 574 ze zm.), w związku z tym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa Politechniki Warszawskiej z wnioskiem o nadanie Pani mgr Martinez stopnia doktora w dyscyplinie inżynieria materiałowa.

Biorąc pod uwagę całość rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie. Wyniki badań zostały opublikowane w znamienitych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania ($IF = 53.3$), co świadczy o ich jakości, kompleksowości i oryginalności. Praca ma charakter interdyscyplinarny, zawiera wyniki badań z obszaru inżynierii i chemii materiałów, biologii, biochemii. Na uwagę zasługuje także aplikacyjność pracy, jej wyniki mogą być wykorzystane w chirurgii implantacyjnej.

Katedra i Zakład Chemii
Farmaceutycznej i Biomateriałów
Joanna Kolmas
prof. dr hab. Joanna Kolmas