



Prof. dr hab. Alina Sionkowska
Katedra Chemii Biomateriałów i Kosmetyków
Wydział Chemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
alinas@umk.pl

Toruń, 19 marca 2024r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Ewy Walejewskiej
pt. „*Development of a Three-Dimensional Tissue-Engineered Model for Osteosarcoma*”.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Wojciecha Świążkowskiego. Praca dotyczy opracowania trójwymiarowego modelu *osteosarcomy* (kostniakomięsaka) z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej.

Kostniakomięsak jest rzadko rozpoznawanym schorzeniem, szczególnie we wczesnym etapie. Jest to złośliwy, pierwotny nowotwór tkanki kostnej, który dotyka również młode osoby. Bardzo ważna jest wczesna diagnoza, jednak pierwsze objawy trudno jest zauważyć, co sprawia dalszy rozwój nowotworu. Modele 3D i ich zastosowanie w badaniach nad nowotworami to nowe podejście, które może umożliwić odwzorowanie fizjologii tkanki a także uwzględnić różnorodność komórek wchodzących w skład nowotworu i jego otoczenia.

Wczesne wykrywanie nowotworów i walka z nimi to ciągle bardzo ważne i aktualne wyzwania, stąd tematyka rozprawy i cele postawione przez Doktorantkę są aktualne i ciekawe, a otrzymane wyniki mogą dostarczyć wielu informacji o charakterze zarówno naukowym jak i mogą mieć znaczenie w rozumieniu tworzenia się nowotworu tkanki kostnej.

Głównym celem jaki postawiła sobie Doktorantka było opracowanie trójwymiarowego modelu *osteosarcomy* z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej. Hybrydowy model obejmował część hydrożelową z osadzoną sferoidą kostniakomięsaka, osadzoną na kompozytowym rusztowaniu, które odzwierciedla zdrową tkankę kostną. Doktorantka za pomocą modelu starała się odwzorować złożone mikrośrodowisko kości. W podejściu biomimetycznym naśladowano strukturę kości, cechy biologiczne, różnorodność komórek oraz oddziaływań między nimi a macierzą zewnątrzkomórkową. W rozważaniach poza strukturą kości, uwzględniano również komponent nowotworowy.

Strategia badawcza została podzielona na kilka części, aby możliwe było opracowanie złożonego hybrydowego modelu. Na cel główny składają się trzy cele szczegółowe.

Celem pierwszym było opracowanie podłoża imitującego zdrową, dojrzałą tkankę kostną. Drugim celem było opracowanie hydrożelowego podłoża wspomagającego tworzenie niezmineralizowanej tkanki kostnej, trzecim zaś celem było opracowanie trójwymiarowego modelu *osteosarcomy*.

Realizując założone cele pracy Doktorantka w pierwszej części pracy skupiła się na modyfikacji architektury rusztowań, poprzez odpowiednie przesunięcie włókien w celu opracowania konstrukcji o przyspieszonej kinetyce degradacji, aby odzwierciedlić proces tworzenia tkanki kostnej. W drugiej części oceniła wpływ modyfikacji architektury na skuteczność zasiedlania komórek kościo- i naczyniotwórczych. W części trzeciej zastosowała podwójne sieciowanie, czyli proces fizyczny i chemiczny w celu modyfikacji GelMA. W ten sposób uzyskano odpowiednią sztywność i aktywność metaboliczną.

Doktorantka do wytwarzania materiałów zastosowała techniki odlewu roztworów polimerowych oraz biodruku 3D, które obecnie są szeroko badane i rozwijane przez różne grupy badawcze pod kątem uzyskania odpowiednich materiałów dla inżynierii tkankowej.

Przedstawiona do recenzji praca napisana jest po angielsku, ale zawiera również streszczenie w języku polskim. Zawarta jest na 220 stronach maszynopisu, nie wliczając opisu dorobku, podziękowań i ogólnego dorobku Doktorantki. Podzielona jest na 8 rozdziałów. Dysertację rozpoczyna abstrakt, streszczenie w języku polskim, a następnie kolejne rozdziały. Rozdział 1 przedstawia wprowadzenie ogólne dotyczące inżynierii tkankowej w regeneracji kości. W rozdziale 2 omówione zostało podejście biomimetyczne do otrzymywania biomateriałów w oparciu o przegląd literatury. W rozdziale 3 postawiono hipotezę i opisano postawione cele pracy. Rozdziały 4-7 to omówienie wyników przedstawionych w dwóch artykułach w czasopismach naukowych, jednego manuskryptu wysłanego do czasopisma oraz jednego w przygotowaniu, w których Doktorantka jest pierwszym autorem.

Część doświadczalną stanowią zatem cztery artykuły, z których dwa są już opublikowane, jeden jest w formie manuskryptu wysłanego do czasopisma zatem zapewne jest w recenzji, natomiast czwarty jest dołączony jako manuskrypt w trakcie tworzenia. Artykuły opublikowane zostały już zrecenzowane przez recenzentów, aby uzyskać odpowiedni status w czasopismach, które należą do grupy dobrych czasopism naukowych. Doktorantka wykazała swój znaczący udział we wszystkich 3 artykułach i manuskrypcie przedstawiając odpowiednie oświadczenia współautorów. Artykuły wchodzące w skład rozprawy to:

1. Walejewska E. et al. The effect of introduction of filament shift on degradation behaviour of PLGA- and PLCL-based scaffolds fabricated via additive manufacturing. *Polymer Degradation and Stability* 2020, 171, 109030.
2. Walejewska E. et al. Navigating osteo-angiogenic dynamic by the combinatory effect of filament shift introduction in TCP-loaded PLGA and PLCL scaffolds guided by MSC-enriched co-culturing conditions. *ACS Biomaterials Science and Engineering* 2024- wysłany do czasopisma.

3. Walejewska E. et al. Tuning physical properties of GELMA hydrogels through microarchitecture for engineering osteoid tissue. *Biomacromolecules* 2024, 25(1), 188–199.
4. Walejewska E. et al. Simplified 3D model for invasion testing: complexified interactions between osteosarcoma cells and bone-mimicking PLGA/20TCP scaffolds. Manuskrypt w trakcie tworzenia (nie wskazano celowego czasopisma).

Każdy z tych artykułów stanowi odpowiednio rozdziały 4, 5, 6 i 7. Dodatkowo, w opisie Doktorantka wskazała powiązania artykułów, uzasadniając ich wykorzystanie w dysertacji.

Obszerny spis literatury zawarty jest na stronach od 197 do 220. Autorka cytuje aż 387 pozycji literaturowych, które są dobrze dobrane i prawidłowo wykorzystane. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że Autorka cytuje głównie prace z ostatnich lat opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych.

Podsumowanie i wnioski końcowe zajmują 2 strony i stanowią rozdział 8 dysertacji. W rozdziale tym zawarto również uwagi na co warto zwrócić uwagę w przyszłości.

Do wytworzenia rusztowania odwzorowującego strukturę i funkcje tkanki kostnej i *osteosarcomy* Doktorantka wykorzystała materiały polimerowe. Zbadała w jaki sposób wprowadzenie przesunięcia filamentu wpływa na degradację skafoldów opartych o PLGA i PLCL oraz kompozyty z TCP (rozdział 4 dysertacji). Następnie zostały przeprowadzone kompleksowe badania biologiczne na otrzymanych biomateriałach w formie 3D (rozdział 5 dysertacji). Doktorantka porównała szereg właściwości kompozytów na bazie PLGA z TCP oraz PLCL z TCP. Wykazała, że kompozyty PLGA z 20% zawartością TCP są obiecującymi materiałami dla inżynierii dojrzałej tkanki kostnej dla hybrydowego modelu 3D *osteosarcomy*. Dlatego też w rozdziale 7 zostały kontynuowane badania nad tym materiałem.

W rozdziale 6 dysertacji przedstawiono badania hydrożeli GelMA. Wykorzystano je ze względu na biokompatybilność oraz łatwość w regulowaniu kształtu i właściwości. Dodatkowo zostały one usieciowane światłem widzialnym oraz zmodyfikowane dodatkiem PEO w celu uzyskania właściwości osteoidu. Połączenie fizycznego oraz chemicznego procesu sieciowania pozwoliło na znaczne obniżenie stężenia hydrożelu oraz czasu jego ekspozycji na światło widzialne. Umożliwiło to zachowanie sztywności podłoża typowego dla osseiny wraz z wysoką aktywnością metaboliczną i ekspresją ALP w osteogennie zróżnicowanych komórkach hBMSC.

Rozdział 7 zawiera wyniki obejmujące oddziaływania komórkowe i materiałowe pomiędzy zasiedlonym rusztowaniem z PLGA/20TCP a hydrożelem odwzorowującym osseinę GelMA z osadzonymi sferoidami kostniakomięsaka.

Kompleksowa charakterystyka materiałów otrzymanych przez Doktorantkę wskazała, że możliwe było opracowanie trójwymiarowego modelu naśladującego środowisko naturalnej tkanki kostnej wraz z trójwymiarowym modelem *osteosarcomy*. Modele takie mogą pomóc w pełnym rozumieniu mechanizmu działania nowotworu.

W badaniach Doktorantka wykorzystywała zarówno metody drukowania 3D jak i techniki otrzymywania filmów metodą odlewu z roztworów. Do charakterystyki materiałów wykorzystała techniki mikroskopowe, badania właściwości mechanicznych i termicznych, badania kąta zwilżania oraz metody spektroskopowe.

Reasumując, Autorka uzyskała ciekawe wyniki, które w jasny sposób przedstawiła najpierw w 4 artykułach, z których 2 zostały opublikowane w czasopismach o wysokim wskaźniku oddziaływania (IF od 5,9 do 6,2), a 2 kolejne są zapewne wysłane do czasopism. Następnie je przedyskutowała poprawnie w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej. Opublikowanie wyników w renomowanych czasopismach naukowych oznacza, że zostały one już zrecenzowane przez badaczy pracujących w danej dziedzinie. Wyniki zaprezentowane w dwóch niezrecenzowanych jeszcze artykułach również stanowią wysoki poziom naukowy.

Po wnikliwym przeczytaniu pracy doktorskiej rodzą się pytania, które powinny być głębiej przedyskutowane:

1. Dlaczego nie policzono swobodnej energii powierzchniowej w rozdziale 4, str. 87?
2. Czy badano parametry żelatyny przed modyfikacją, czy opierano się na danych producenta?
3. Jaki jest mechanizm sieciowania materiałów światłem widzialnym?
4. Czy możliwe jest otrzymanie materiałów kompozytowych o większych rozmiarach niż te uzyskane w ramach pracy doktorskiej?

Oceniając pracę od strony edycyjnej, należy podkreślić, że praca napisana jest bardzo starannie, a błędy literowe występują bardzo rzadko. Bardzo ładna jest również szata graficzna rozprawy. Styl pisania pracy jest jasny i zrozumiały, co sprawia, że pracę czyta się z przyjemnością.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że wymienione przeze mnie uwagi i postawione pytania w żaden sposób nie obniżają wartości merytorycznej pracy, a wyniki są wartościowe i mogą przyczynić się do pełnego zrozumienia mechanizmu działania nowotworu kości.

Praca zawiera dużo oryginalnych wyników o dużym znaczeniu poznawczym, a do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam:

1. Modyfikację materiału opartego na PLGA/TCP i PLCL/TCP do potrzeb inżynierii tkanki kostnej.
2. Wykazanie, że sztywniejszy materiał oraz przesunięcie włókien sprzyjały lepszej adhezji komórek.
3. Wykazanie, że podwójne sieciowanie (fizyczne i chemiczne), może pozwolić na dwukrotne obniżenie stężenia hydrożelu oraz czasu jego ekspozycji na światło widzialne.
4. Opracowanie trójwymiarowego modelu odwzorowującego mikrośrodowisko tkanki kostnej z *osteosarkoma*.

Biorąc pod uwagę całość badań, oryginalność i jakość wyników a także rozbudowaną ich dyskusję oraz potencjalne zastosowanie w rozumieniu mechanizmu działania nowotworu uważam, że praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym (art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018). Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Ewy Walejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych o dużych czynnikach wpływu oraz wykazują potencjał w rozumieniu nowotworów tkanki kostnej wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.


Prof. dr hab. Alina Sionkowska