



Lublin, dn. 20.03.2024 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Ewy Walejewskiej pt. „Development of a three-dimensional tissue-engineered model of Osteosarcoma” wykonanej na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej

Przedstawiona do oceny praca doktorska pt. „Development of a three-dimensional tissue-engineered model of Osteosarcoma” wykonana została pod kierunkiem Pana Promotora Prof. Dr hab. Inż. Wojciecha Święczkowskiego. Jest ona kontynuacją interesujących i nowoczesnych badań nad biomateriałami prowadzonymi od wielu lat przez zespół kierowany przez prof. W. Święczkowskiego. Oceniana dysertacja stanowi cykl dwóch wieloautorskich publikacji oryginalnych i dwóch przygotowanych manuskryptów.

1. Ewa Walejewska, Joanna Idaszek, Marcin Heljak, Adrian Chlanda, Emilia Choinska, Vasif Hasirci, Wojciech Swieszkowski. The effect of introduction of filament shift on degradation behaviour of PLGA- and PLCL-based scaffolds fabricated via additive manufacturing. Opublikowane w Polymer Degradation and Stability 171: 0141-3910, 2020 (Rozdz. 4), IF=5,9; 100 pkt MN, autor korespondencyjny W. Święczkowski
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.109030>
2. Ewa Walejewska, Alessia Paradiso, Joanna Idaszek, Aleksandra Starosz, Marcin Heljak, Maciej Łojkowski, Marina Volpi, Kamil Grubczak, Wojciech Swieszkowski. Navigating osteo-angiogenic dynamics by the combinatory effect of filament shift introduction in TCP-loaded PLGA and PLCL scaffolds guided by MSC-enriched co-culturing conditions. Manuskrypt (rozdz.5)
3. Ewa Walejewska, Ferry P.W. Melchels, Alessia Paradiso, Andrew McCormack, Karol Szlęzak, Alicja Olszewska, Michał Srebrzyński, Wojciech Swieszkowski. Tuning physical properties of GelMA hydrogels through microarchitecture for engineering osteoid tissue. Zaakceptowane w ACS Biomacromolecules w 2023 <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00909> (rozdz.6) IF=6,2; 140 pkt MN, autorzy korespondencyjni E. Walejewska i W. Święczkowski
4. Ewa Walejewska, Aleksandra Starosz, Marzena Zychowicz, Kamil Grubczak, Marcin Moniuszko, Leonora Bużańska, Wojciech Swieszkowski. Simplified 3D Model for Invasion Testing: Complexified Interactions Between Osteosarcoma Cells and Bone-mimicking PLGA/20TCP Scaffolds. Manuskrypt (rozdz. 7)

Łączna wartość publikacji z udziałem Doktorantki, wchodzących w skład dysertacji – zgodnie z wykazem punktowanych czasopism – wynosi 240 pkt, zaś wartość współczynnika IF wg listy JCR – 12,1. We wszystkich wymienionych pracach Pani mgr Ewa Walejewska jest pierwszą autorką, a złożone oświadczenia pozostałych współautorów są dowodem na wiodący udział Doktorantki w ich powstaniu (udział na poziomie 58-60%). Zgłoszona do oceny praca doktorska w postaci cyklu prac badawczych została napisana w języku angielskim. Opracowanie dysertacyjne zawiera: abstrakty w j. angielskim i polskim, spis



treści, listę skrótów i symboli oraz rozdziały opisujące badania. Są to: rozdziały 1-2 stanowiące wprowadzenie w temat badawczy; rozdział 3 zawierający cel i postawione hipotezy; rozdziały 4 -7, zawierające treści dwu publikacji oraz dwa opisy badań doktorantki, przedstawione w formie manuskryptów przygotowanych do redakcji; rozdział 8 stanowiący podsumowanie uzyskanych wyników badawczych oraz zarys planowanych badań Doktorantki dotyczących pogłębienia wiedzy na temat hybrydowego modelu 3D opracowanego dla osteosarcomy. Końcowa część dysertacji to cytowane piśmiennictwo, podziękowania, CV, lista publikacji oraz wykaz rycin i tabel.

Wartość naukowa rozprawy doktorskiej

Osteosarcoma (kostniakomięsak, mięsak kościopochodny) jest drugim co do częstości występowania (po szpiczaku) pierwotnym nowotworem kości, stanowi 20% wszystkich mięsaków kości, jednak ze względu na rzadkość występowania, ale też szybki rozwój kostniakomięsak stwarza trudności w zakresie wczesnej diagnozy i leczenia. Zbadanie patogenezy, wyjaśnienie mechanizmów dotyczących namnażania się osteosarkomy w zdrowej tkance kostnej, a także ocena potencjalnych w tym przypadku podejść terapeutycznych jest poważnym wyzwaniem dla naukowców, bowiem osiągnięte rezultaty badawcze mogą w przyszłości poprawić rokowania dotyczące przeżycia pacjentów. Wstęp dysertacji (rozdziały 1-2) bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę badawczą. Doktorantka prawidłowo dokonała selekcji najnowszego piśmiennictwa z zakresu wspomnianej tematyki badawczej. Na początku tej części pracy Doktorantka zapoznała czytelnika z budową tkanki kostnej i charakterystyką metabolizmu kostnego, wprowadziła opis roli inżynierii tkankowej w regeneracji kości, dokonała charakterystyki biomateriałów wykorzystywanych w inżynierii tkanki kostnej do budowy rusztowań dla inżynierii tkankowej. W rozdz. 2 przedstawiła możliwości imitowania systemów biologicznych w inżynierii tkankowej w celu badania niszy osteosarcomy, w tym opisała trójwymiarowe modele hodowli, a także sferoidy wielokomórkowe, czyli modele bez rusztowań. Doktorantka prawidłowo dokonała selekcji najnowszego piśmiennictwa z zakresu tematyki badawczej oraz umiejętnie uzasadniła konieczność podjęcia badań stanowiących przedmiot ocenianej pracy.

Autorka, po analizie przeglądu piśmiennictwa, przedstawiła potrzebę opracowania modelu 3D obejmującego integrację biomateriałów ściśle naśladujących powierzchnię styku pomiędzy kością natywną, zarówno w stanie dojrzałym, jak i niezmineralizowanym, a nowotworem (Rozdz. 3). Główne cele badań Doktorantki to: 1- Opracowanie podłoża imitującego zdrową, dojrzałą tkankę kostną; 2- Opracowanie hydrożelowego podłoża wspomagającego tworzenie niezmineralizowanej tkanki kostnej; 3- Opracowanie trójwymiarowego modelu osteosarcomy.

W ramach pierwszej z cyklu pracy eksperymentalnej (Rozdz. 4) Doktorantka postawiła sobie za cel opracowanie procesu wytwarzania rusztowań opartych na polimerach PLGA i PLCL, zawierających cząstki TCP za pomocą druku 3D z wykorzystaniem technologii Fused Deposition Modeling (FDM), należącej do technik przyrostowych osadzania kolejnych warstw skafoldu. Zaproponowane zostały dwie różne architektury



rusztowania, tj. nieprzesuniętej (-S) (orientacja włókien między sąsiednimi warstwami 0/90) i przesuniętej (+S). W ramach powyższej pracy badano wpływ wprowadzenia przesunięcia włókien w warstwie $n+2$ na zachowanie degradacyjne rusztowań na bazie polimeru. Wykazano, że wprowadzenie przesunięcia włókien przyspiesza degradację rusztowania. W świetle przedstawionych wyników wpływu wprowadzenia przesunięcia włókien na zachowanie degradacji rusztowania wskazano, że modyfikacja architektury rusztowania w postaci przesunięcia włókna w warstwie $n+2$ może wpływać na kinetykę procesu degradacji. Warto podkreślić, że w badaniach Doktorantki wykorzystane zostały biomateriały polimerowe z dodatkiem TCP (trójfosforanu wapniowego), który jest powszechnie stosowany w implantacjach do tkanki kostnej ze względu na właściwości osteoprzewodzące, sprzyjające adhezji, proliferacji i różnicowaniu komórek. Cechą korzystną tego składnika materiałowego jest też to, że w miarę stopniowego rozkładu TCP uwalnia jony wapnia i fosforanu do otaczającego środowiska, co odgrywa kluczową rolę w mineralizacji kości. W oparciu o ustalenia z badania degradacji rusztowań, wybranie wydrukowanych w 3D konstruktów z wprowadzeniem przesunięcia włókien w co trzeciej warstwie konstruktów, wydawało się uzasadnione do dalszych badań ze względu na zaobserwowaną ich przyspieszoną szybkość degradacji w porównaniu z rusztowaniami nieprzesuniętymi. Wybór ten miał na celu imitację procesu przebudowy kości obserwowanego *in vivo*.

Dalsza część badań (rozdz. 5) dotyczyła badania wpływu rodzaju materiału (PLGA/20TCP i PLCL/20TCP) i jego architektury (przesunięte i nieprzesunięte rusztowania) na namnażanie komórek kościotwórczych i naczyńotwórczych oraz oceny wpływu na ekspresję fosfatazy alkalicznej ALP i białka CD31 – krytycznych markerów potencjału osteogennego i angiogenego. Warto tu podkreślić, że testowane były różne warunki hodowli, mianowicie: 1) współhodowla obejmująca ludzkie osteoblasty płodowe (hFOB) i ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) oraz ii) trikultura obejmująca hFOB, HUVEC i mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (hBMSC). Korzystnie należy ocenić wybór typu komórek w powyższych eksperymentach. Mezenchymalne komórki macierzyste i komórki śródbłonna odgrywają bowiem kluczową rolę w początkowych stadiach regeneracji kości, więc wspólna hodowla HUVEC z MSC może zapewnić kilka korzyści w zakresie lepszego tworzenia sieci naczyniowej. Na podstawie uzyskanych rezultatów warto zauważyć, że konstrukty PLGA/20TCP, charakteryzujące się zwiększoną sztywnością materiału w porównaniu z konstrukcjami opartymi na PLCL wykazywały silne właściwości indukujące kość i działanie proangiogenne. Wprowadzenie przesunięcia włókien w architekturze rusztowania zwiększyło uwięzienie komórek, wykazując zwiększoną skuteczność zaszczepiania, przewyższającą konstrukcję bez przesunięcia włókien. Włączenie komórek MSC do wspólnej hodowli hFOB i HUVEC spowodowało podwyższoną aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP), sygnalizując rozpoczęcie mineralizacji macierzy pozakomórkowej (ECM). Biorąc pod uwagę te ustalenia, Doktorantka podkreśliła korzystną rolę rusztowań PLGA/20TCP w inżynierii tkanki kostnej, mogących służyć jako model kości (BM) w hybrydowym modelu 3D kostniakomięsaka (BTM). Co więcej warto zauważyć, że wraz z wprowadzeniem przesunięcia włókien przyspieszającym



kinetykę degradacji, wybrane rusztowania 3D mają potencjał do opracowania konstrukcji naśladujących kości, gdzie takie właściwości są pożądane.

Kolejny etap badawczy to uzyskanie stopniowo degradowalnych matryc, naśladujących sztywność niezmineralizowanej tkanki kostnej tzw. osteoidu wytwarzanego naturalnie przez kostniakomięsaka osteoblastycznego, będącego siecią złożoną głównie z kolagenu typu I i białek macierzy kostnej i stanowiącego podstawę tworzenia kości. Jest to, jak podkreślają współautorzy tej opublikowanej pracy, nowatorskie podejście do inżynierii rusztowań podobnych do osteoidów poprzez syntetyczne powielenie właściwości macierzy tkanki osteoidowej. Celem tej części dysertacji (rozdział 6), co podkreśliła Doktorantka, było bowiem odtworzenie środowiska, w którym rozwija się wymieniony nowotwór. Aby stworzyć platformę przypominającą tkankę osteoidową zoptymalizowano mikroarchitekturę hydrożeli opierającej się na metakrylowanej żelatynie (GelMA). Wykorzystano dwie strategie sieciowania (SC - sieciowane standardowe w oparciu o ekspozycję na światło widzialne i DC - sieciowanie podwójne, obejmujące fizyczne żelowanie i ekspozycję na światło widzialne) w celu uzyskania sztywności podobnej do osteoidu. Jednocześnie podjęto próby wytworzenia hierarchicznej struktury porów hydrożeli poprzez dodanie poli(tlenku etylenu) jako porogenu. Wykazano, że zmniejszając stężenie GelMA z 10% do 5%, podwójnie usieciowany hydrożel osiągnął moduł ściskania ~17 kPa i wykazywał zdolność wspomagania tworzenia kości, o czym świadczyła obecność fosfatazy alkalicznej obserwowana przez 3 tygodnie inkubacji w podłożu osteogennym. W tej części pracy oceniono biologicznie wytworzone hydrożele GelMA, wykorzystując do tego macierzyste komórki mezenchymalne hBMSC pochodzące ze szpiku kostnego. Jednak włączenie politlenku etylenu (PEO) do próbek hydrożeli utrudniło wytwarzanie wysoce porowatych hydrożeli, prowadząc do pogorszenia przeżycia komórek i zmniejszonego różnicowania osteogennego w wyniku niecałkowitego usunięcia PEO.

W ramach kolejnej części prac eksperymentalnych dysertacji (rozdział 7) w celu odtworzenia tkanek zaangażowanych w progresję mięsaka kostnego in vivo opracowano hybrydowy model 3D łączący osteosarcomę i zdrową tkankę kostną. W tym celu wykorzystane zostały przesunięte rusztowania PLGA/20TCP zaszczerpione komórkami hFOB, HUVEC (ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej) i hBMSC, które integrowano z podłożem hydrożelowym GelMA zawierającym sferoidy osteosarcomy, wytworzone z agregatów komórek MG-63. Powstał w ten sposób model guza kości. Dla prawidłowości eksperymentu i kompleksowego zrozumienia zachodzących mechanizmów biologicznych uwzględniono także grupy kontrolne składające się z i) niezaszczerpionych komórkami rusztowań PLGA/20TCP i GelMA z osadzonymi sferoidami osteosarcomy oraz ii) podłożu GelMA bez sferoidów umieszczone na rusztowaniach PLGA/20TCP zaszczerpionych komórkami hFOB, HUVEC i hBMSC. **Ta część ocenianej dysertacji warta jest podkreślenia, bowiem stanowi hybrydowe potraktowanie tematu badawczego: a więc połączenie inżynierii materiałowej, inżynierii tkanki kostnej i badań z zakresu biologii komórkowej nad kostniakomięsakiem. Jest to więc podejście badawcze prawie kompleksowe, co jest w przypadku specjalizacji inżynierii materiałowej posiadanej przez Doktorantkę, wyzwaniem ogromnym. Warto więc podkreślić dużą wartość poznawczą i innowacyjność badań zaproponowanych i zrealizowanych przez mgr inż. E.**



Walejewską w celu imitacji procesu nowotworzenia tkanki kostnej poprzez częściowe badanie kaskad sygnalizacyjnych regulujących zachowanie nowotworu w złożonym mikrośrodowisku guza.

W ostatniej części dysertacji (Rozdział 8) Autorka zawarła podsumowanie uzyskanych wyników badawczych oraz zarysowała propozycje badań na przyszłość.

Ocena

Komórkowe pochodzenie kostniakomięśaka pozostaje przedmiotem ciągłych badań w wielu laboratoriach na świecie. W kontekście badań nad kostniakomięśakiem inżynieria tkankowa stanowi obiecujące narzędzie, oferujące połączenie między badaniami laboratoryjnymi, a zastosowaniami klinicznymi. Warto podkreślić, że model hybrydowy nowotworu osteosarcomy 3D zaproponowany przez Doktorantkę imituje w pewnym sensie stan rzeczywisty rozwoju kostniakomięśaka w kości pacjenta. W modelu tym mamy biomimetyczne rusztowanie kompozytowe zawierające namnażające się komórki hFOB, HUVEC i hBMSC, co sprzyja tworzeniu zdrowej, dojrzałej kości oraz sferoidy komórek macierzystych osteosarcomy w składniku hydrożelowym naśladującym osteoidy, tworzone w trakcie nowotworzenia, co podkreśla zasadniczą rolę mikrośrodowiska w inwazji nowotworu. Odtwarzając złożone mikrośrodowisko, w którym rozwija się nowotwór, możliwe jest badanie zachowania nowotworu w kontrolowanym systemie w celu opracowania nowych terapii i strategii leczenia. To innowacyjne podejście badawcze (model 3 D) obejmujące integrację biomateriałów ściśle naśladujących powierzchnię styku pomiędzy kością natywną, zarówno w stanie dojrzałym, jak i niezmineralizowanym, a nowotworem, może ułatwić badanie kaskad sygnalizacyjnych regulujących zachowanie nowotworu w złożonym mikrośrodowisku.

Warto podkreślić, że zaawansowane modele nowotworu 3D w hodowli komórkowej *in vitro* mogą poprawić przewidywalność badań przedklinicznych i znacznie poprawić tłumaczenie kliniczne. Chciałabym podkreślić, że opracowany przez Autorkę model osteosarcomy stanowić może potencjalną platformę do dalszego badania zarówno możliwości regeneracyjnych, jak i patogennych tkanki kostnej. Godne zauważenia jest interdyscyplinarne podejście Autorki do tematu badawczego łączącego wiedzę inżynierską ze spostrzeżeniami biologicznymi, mające na celu dokładne zrozumienie wzajemnych zależności pomiędzy zmodyfikowaną tkanką kostną, a składnikami nowotworu.

Podsumowanie recenzji

Oceniając dysertację mgr inż. Ewy Walejewskiej stwierdzam, że Doktorantka wykazała się umiejętnościami prowadzenia prac eksperymentalnych oraz krytycznej dyskusji naukowej. Oceniana praca wyróżnia się oryginalnością zastosowanych metod i narzędzi badawczych, a przedstawiony zakres badań i zastosowane metody badawcze doprowadziły do zrealizowania zaplanowanego przez Autorkę celu. Rozprawa doktorska dotycząca opracowania trójwymiarowego modelu osteosarcomy z wykorzystaniem inżynierii tkankowej prezentuje wysoki poziom poznawczy z uwagi na rangę rozwiązywanego problemu badawczego, jak i zakresu przeprowadzonych badań materiałowych i eksperymentów z



zakresu biologii komórkowej. Spełnia warunek rozwiązania oryginalnego problemu naukowego.

Podsumowując, chcę podkreślić, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Ewy Walejewskiej prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny. Wartością dodaną jest także osiągnięty dorobek naukowy Doktorantki składający się 5 publikacji (2 w doktoracie i 3 poza), 5 komunikatów i 1 zgłoszenia patentowego do UP RP z 2023 r.

Z obowiązku Recenzenta mam kilka drobnych uwag formalnych.

Przykładowe uwagi:

- Sformułowanie zamieszczone w abstrakcie PL dysertacji - ... *komponentę* nowotworową oraz ... *komponentę* zdrowej tkanki kostnej – powinno zostać zastąpione prawidłowym słowem *komponent* nowotworowy i *komponent* zdrowej tkanki kostnej. Komponent (rodzaju męskiego) to składnik, element, ale komponenta (rodzaju żeńskiego) to czynnik modyfikujący lub cecha wynikająca z modyfikacji.
- w Sformułowaniu „Human Fetal Osteoblasts (hFOB 1.19) were received as a kind gift from the Department of Regenerative Medicine and Immunoregulation, Medical University of Białystok.” zamieszczone na str 104 dysertacji (Rozdział 5, część 5.2 Experimental section 5.2.1 Materials) oraz w Sformułowaniu „Human Fetal Osteoblasts (hFO B 1.19) were received as a kind gift from the Department of Regenerative Medicine and Immunoregulation, Medical University of Białystok, Poland.” na str 169 (Rozdział 7, część 7.2 Materials and methods 7.2.1 Material) należy zwrócić uwagę na pochodzenie linii hFOB. Podany w opisie nr linii jako 1.19 jest charakterystyczny dla linii hFOB pochodzącej z banku ATCC. Jeżeli tak jest, powinno to być podane w opisie dysertacji w pkt. Materials. Należy tu dodać, że kupowana linia komórkowa ma certyfikat i przynależy tylko do kupującego. Nie można jej użyczać innemu podmiotowi. Tak więc, jeżeli zostały wykorzystane w badaniach własnych Doktorantki osteoblasty zakupione przez UM w Białymstoku i użyczone przez UM do badań w innym ośrodku, to jest to błędne postępowanie. Ten błąd może zostać wytknięty przez recenzentów wydawnictwa, do którego zostanie przesłany manuskrypt. A jeżeli wymieniony podmiot (UM w Białymstoku) sam wyizolował komórki z materiału od pacjenta i przekazał to Doktorantce, to należy podać w opisie nr zgody komisji bioetycznej wraz z jej adresem, na izolację komórek od pacjenta.

Chciałabym podkreślić, że wyżej wymienione uwagi nie wpływają na bardzo wysoką wartość merytoryczną niniejszej pracy.

Prosiłabym Doktorantkę o komentarz/informację do następujących kwestii:

- Gdzie były prowadzone eksperymenty z udziałem linii komórkowych, czy było to wystandaryzowane laboratorium i odpowiednio wyposażone, jakie doświadczenie praktyczne i merytoryczne ma Pani w tym zakresie,
- Interesuje mnie jaki jest stan obecny dwu manuskryptów zamieszczonych w dysertacji, a w oświadczeniach współautorów badań podanych omyłkowo jako publikacje.



Wnioski końcowe

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona przez Panią mgr inż. Ewę Walejewską rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.), w związku z czym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa Politechniki Warszawskiej z wnioskiem o nadanie Pani mgr Ewie Walejewskiej stopnia doktora w dyscyplinie Inżynieria Materiałowa.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej mgr Ewie Walejewskiej oraz spełnienie warunków wyróżnienia rozpraw doktorskich obowiązujące na mocy Uchwały nr 196/II/2022 Rady Naukowej PW wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej pracy stosowną nagrodą.