

Mgr inż. Ewa Walejewska

Temat pracy doktorskiej: „*Development of a three-dimensional tissue-engineered model of osteosarcoma*”

STRESZCZENIE

Osteosarcoma (kostniakomięsak, mięsak kościopochodny) jest złośliwym, pierwotnym nowotworem tkanki kostnej, dotyczącym dzieci i młodzieży. W Polsce rozpoznaje się około 30-35 przypadków kostniakomięsaka rocznie według danych Instytutu Matki i Dziecka. Ze względu na rzadkość pierwotnych nowotworów kości, pierwsze objawy choroby mogą być łatwo ignorowane lub błędnie diagnozowane.

Nowotwory kości rozwijają się w środowisku, które sprzyja ich wzrostowi. Kość jest tkanką dynamicznie zmieniającą się, w takich sytuacjach komórki nowotworowe są w stanie wykorzystać cząsteczki adhezyjne, białka macierzy zewnątrzkomórkowej i inne czynniki prowadzące do ich przetrwania, a ostatecznie ułatwiające proces przerzutu.

Aby zrozumieć mechanizm leżący u podstaw progresji nowotworu, złożone mikrośrodowisko komórkowe musi zostać opracowane jako bardziej przewidywalne systemy tkankowe. Podczas gdy hodowle 2D *in vitro* odegrały znaczącą rolę w rozwoju badań nad nowotworem, posiadają one ograniczenia, jeśli chodzi o uchwycenie pełnego spektrum ekspresji genów, splicingu, topologii i biochemii charakteryzujące komórki nowotworowe. Zastosowanie modeli 3D w badaniach nad nowotworami jest obiecującym podejściem, które umożliwi odwzorowanie fizjologii tkanki oraz uwzględnienie różnorodności komórek wchodzących w skład nowotworu i jego otoczenia.

W związku z tym, głównym celem pracy doktorskiej było opracowanie trójwymiarowego modelu *osteosarcomy* z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej. Prezentowany hybrydowy model obejmuje część hydrożelową z osadzoną sferoidą kostniakomięsaka, umieszczoną na kompozytowym rusztowaniu, które odzwierciedla zdrową tkankę kostną. Opracowany model pozwolił odwzorować złożone mikrośrodowisko kości, naśladując jej strukturę i charakterystyczne cechy biologiczne, w tym różnorodność komórek, interakcje między nimi a otaczającą macierzą zewnątrzkomórkową, uwzględniając również komponentę nowotworową.

Aby osiągnąć cel główny pracy i potwierdzić jej hipotezę, że *możliwe jest opracowanie hybrydowego modelu in vitro zawierającego komponentę zdrowej tkanki kostnej oraz osteosarcomy- odwzorowującego warunki in vivo*, z wykorzystaniem podejścia inżynierii tkankowej, strategia badawcza została podzielona na trzy cele szczegółowe:

CEL 1: Opracowanie podłoża imitującego zdrową, dojrzałą tkankę kostną:

- w **pierwszej części** pracy skupiono się na modyfikacji architektury rusztowań, wprowadzając przesunięcie włókien w co trzeciej warstwie rusztowania bez zmiany ich początkowej porowatości oraz stosunku powierzchni do objętości. Przesunięcie włókien miało na celu opracowanie konstrukcji o przyspieszonej kinetyce degradacji, odzwierciedlając proces tworzenia tkanki kostnej. Zmiana układu włókien wpłynęła na krętość kanałów porowych, zmniejszając przepuszczalność hydrauliczną rusztowania i powodując akumulację kwaśnych produktów ubocznych degradacji;

- **druga część** rozprawy ocenia wpływ modyfikacji architektury (z przesunięciem włókien i bez) oraz materiału rusztowania (PLGA/20TCP i PLCL/20TCP) na skuteczność zasiedlania komórek kościo- i naczyniotwórczych. Wykazano, że sztywniejszy materiał PLGA/20TCP oraz przesunięcie włókna sprzyjały lepszej adhezji komórek. Wprowadzenie ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych wyizolowanych ze szpiku kostnego (hBMSC) do współhodowli ludzkich płodowych osteoblastów (hFOB) i ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) spowodowało zwiększoną ekspresję fosfatazy alkalicznej (ALP) i białka CD31 w modelu kości.

CEL 2: Opracowanie hydrożelowego podłoża wspomagającego tworzenie niezmineralizowanej tkanki kostnej (osseiny), obejmującego:

- **trzecią część** pracy, w której wykazano, że podwójne sieciowanie GelMA, łączące zarówno proces fizycznego, jak i chemicznego sieciowania pozwoliło na dwukrotne obniżenie stężenia hydrożelu oraz czasu jego ekspozycji na światło widzialne. Działania te umożliwiły jednoczesne zachowanie sztywności podłoża typowego dla osseiny, wynoszącej około 17 kPa, wraz z wysoką aktywnością metaboliczną i ekspresją ALP w osteogennie zróżnicowanych hBMSC.

CEL 3: Opracowanie trójwymiarowego modelu osteosarcoma, obejmującego:

- **czwartą część**, w której oceniono interakcje komórkowe i materiałowe pomiędzy zasiedlonym rusztowaniem PLGA/20TCP z zastosowanym przesunięciem włókien a hydrożelem odwzorowującym osseinę GelMA, zawierającym osadzone sferoidy kostniakomięsa. Lokalną inwazję komórek oceniano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, a poziomy cytokin wydzielanych przez komórki do pożywki hodowlanej mierzono w trakcie 32-dniowego okresu inkubacji.

Podsumowując, skutecznie opracowano trójwymiarowy model wykorzystujący podejście inżynierii tkankowej, jednocześnie potwierdzając hipotezę badawczą pracy. Model ten z

powodzeniem odwzorował złożone mikrośrodowisko naturalnej tkanki kostnej, uwzględniając różnorodność komórkową oraz interakcje między komórkami a macierzą pozakomórkową. Co zaskakujące, nawet w obliczu zastosowania różnorodnych linii komórkowych, w tym MSC znanych ze swoich zdolności modulacyjnych, komórki osteosarcomy zignorowały zaproszenie do inwazji zdrowej struktury tkanki kostnej. Dlatego też uwzględnienie dodatkowych elementów, takich jak integracja komórek układu odpornościowego oraz badanie nowych spersonalizowanych rozwiązań terapeutycznych, może pomóc w pełnym zrozumieniu mechanizmu działania nowotworu.

Słowa kluczowe: poliestry, druk 3D, degradacja, tkanka kostna, hydrożele, komórki nowotworowe, osteosarcoma, 3D model, interakcje komórkowe

Wolfgang Ene

Mgr inż. Ewa Walejewska

Temat pracy doktorskiej: „*Development of a three-dimensional tissue-engineered model of osteosarcoma*”

ABSTRACT

Osteosarcoma, a malignant primary bone tumor affecting children and young adolescents, is a rare condition with approximately 30-35 cases diagnosed annually in Poland, according to the Institute of Mother and Child. Since they are exceptionally rare in population, the first symptoms of cancer can be easily ignored or misdiagnosed.

Bone has unique characteristics that can in fact enhance tumor growth. It undergoes constant remodeling and comprises diverse environments. In such scenarios, tumor cells are in the position of taking advantage of adhesion molecules, matrix protein and other factors leading to their survival and ultimately facilitate metastatic progression.

To understand the mechanism underlying cancer invasion, the complex cellular microenvironment needs to be deconstructed and reconstructed as more predictable engineered systems. While 2D in vitro studies have played a significant role in advancing cancer research, they have limitations when it comes to capturing the full spectrum of gene expression, splicing, topology, and biochemistry in cancer cells. Utilizing 3D models in cancer research presents an intriguing approach, as it offers a more physiologically relevant platform that allows for the capture of tumor involved cells' heterogeneity and their surrounding microenvironment.

Consequently, the doctoral thesis had the overarching goal of creating a three-dimensional osteosarcoma model using tissue engineering approach. This hybrid model consists of a hydrogel matrix with embedded osteosarcoma spheroids placed on composite scaffolds that promoted the formation of healthy bone tissue. The as developed model presents a complex microenvironment recapitulating the structure and biological features of native bone tissue, encompassing cellular diversity and interactions among cells and the extracellular matrix, together with tumor component.

To reach the overall aim of the thesis and prove its hypothesis: *it is possible to develop a hybrid in vitro model of osteosarcoma-healthy bone tissue resembling in vivo conditions* using tissue engineering approach, the research strategy was divided into three specific aims:

AIM 1: To develop a healthy bone-mimicking platform, including:

- **first part** of the thesis, focusing on altering the scaffold architecture in 0/90 lay-down pattern without modifying its initial porosity and surface-area-to-volume-ratio. The

introduction of filament shift aimed to create constructs with accelerated degradation kinetics to align with bone tissue formation. The filament shift increased the structure tortuosity, modifying hydraulic permeability, and causing a build-up of acidic degradation byproducts;

- **second part** of the study addressing whether the architecture modification (shifted and non-shifted scaffolds) and material characteristics (PLGA/20TCP and PLCL/20TCP) influenced seeding efficiency of bone- and vessel-forming cells. It was demonstrated that stiffer PLGA/20TCP material and shifted constructs itself supported better cell adherence. Addition of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBMSC) to a co-culture of human fetal osteoblasts (hFOB), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) supported high alkaline phosphatase (ALP) and CD31 protein expression.

AIM 2: To develop a hydrogel platform supporting unmineralized tissue (osteoid) formation, including:

- **third part**, which established that dual crosslinking of GelMA through a combination of physical and chemical gelation allowed for a reduction of hydrogel concentration and exposure time to visible light. Notably, this adjustment maintained a substrate stiffness of approximately 17 kPa, falling within the range of osteoid stiffness, while facilitating high metabolic activity of cells and ALP expression by osteogenically differentiated hBMSC.

AIM 3: To develop a three-dimensional osteosarcoma model, involving:

- **fourth part**, which assessed cellular and material interactions between scaffolds mimicking healthy bone (matured PLGA/20TCP with filament shift) and osteoid-resembling GelMA, containing embedded osteosarcoma spheroids. Local cell invasion was evaluated through fluorescence microscopy, and the levels of cytokines secreted by cells into the culture medium were measured over a 32-day of co-incubation period.

In conclusion, a three-dimensional model utilizing a tissue-engineering approach was successfully developed, simultaneously confirming the initial hypothesis. The model recreated the complex microenvironment of native bone tissue, including cellular diversity and interactions among cells and the extracellular matrix. In a surprising twist, even with a diverse ensemble of cell lines, which included the versatile MSC known for its modulating abilities, the osteosarcoma cells appeared to have neglected their invitation to infiltrate the healthy bone environment. Thus, the model laid the foundation for potential enhancements, including the integration mediator cells within the adaptive immune response and the exploration of novel personalized therapeutic approaches. It provides a valuable tool for analyzing complex cell interactions between healthy and malignant bone tissue.

Keywords: polyesters, 3D printing, degradation, bone tissue, hydrogels, tumor cells, osteosarcoma, 3D model, cell interactions.

Maipensha
Gno