

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Walejewskiej

„ Development of a three-dimensional tissue-engineered model of osteosarcoma”

Recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo z-cy Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa - Politechnika Warszawska, pani prof. dr hab. inż. Anny Boczkowskiej, dotyczącego uchwały Rady Dyscypliny Naukowej z dnia 15.12.2023. powołującej mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej p. mgr. inż. Ewy Walejewskiej.

Wstęp

Przedstawiona do recenzji praca pt. *Development of a three-dimensional tissue-engineered model of osteosarcoma*, wykonana została pod opieką promotorską pana prof. dr hab. inż. Wojciecha Świążkowskiego, na Wydziale Inżynierii Materiałowej, Politechniki Warszawskiej.

Praca doktorska p. mgr inż. Ewy Walejewskiej ukierunkowana jest na możliwości, jakie stwarza inżynieria tkankowa w badaniach nad nowotworem tkanki kostnej. Osteosarcoma (Kostniakomięsak) jest nowotworem kości, charakteryzującym się znaczną odpornością, zarówno na interwencje chirurgiczne, jak i chemoterapię. Nie ma zatem wątpliwości, że poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych, to niezwykle aktualny i wartościowy obszar badań.

Jak wynika z danych literaturowych inżynieria tkankowa i strategię medycyny spersonalizowanej wydają się zachęcającymi alternatywami dla konwencjonalnych terapii przeciwko kostniakomięsakowi. Badania nad nowotworem kości prowadzone są, m. in. z wykorzystaniem dwuwymiarowych (2D) modeli *in vitro*, stosowanych w badaniach biologii komórkowej i molekularnej, jednak charakteryzują się one słabą zdolnością translacji *in vitro-in vivo*. Z tego względu w ostatnim czasie wyraźnie wzrosło zainteresowanie podłożami tkankowymi typu 3D, w tym w znacznej mierze takimi, które wytwarzane mogą być technikami przyrostowymi. Inżynieria tkankowa znana jest już od około 30-stu lat, a wiedza jaka w tym czasie nagromadzona, stanowi podstawy medycyny regeneracyjnej i może zostać wykorzystana do nowych, niezwykle pożądaných działań, jakimi są badania w zakresie nowych terapii antynowotworowych. Dlatego też wprowadzenie metod inżynierii

tkankowej do nowych zastosowań, związanych z badaniami nad szeroko pojętymi właściwościami nowotworów tkanki kostnej jest zapewne bardzo perspektywnym tematem badań. Wydaje się zatem oczywiste, że układy 3D, posiadające zarówno właściwości osteogenne, jak i charakteryzujące się toksycznością w kierunku komórek nowotworowych, to rozwiązania o wysokim potencjale aplikacyjnym, który jak wynika z wielu danych nie został do tej pory w pełni wykorzystany. Podłoża 3D mogą być, zarówno wykorzystane w badaniach *in vitro* w zakresie analizy tkanek nowotworowych, jak i mogą być wszczepiane w miejsce ubytku tkanki kostnej, powodując jej regenerację, jak i stanowić mogą nośniki leków przeciwnowotworowych. W każdym przypadku problemem jest odpowiednia konstrukcja podłoża tkankowego o parametrach mikrostrukturalnych, fizycznych, chemicznych i biologicznych, odpowiadających konkretnym zastosowaniom w pierwszej kolejności w badaniach nad nowotworami, zaś w dalszej nad wprowadzeniem ich do zastosowań klinicznych. Zatem tworzenie realistycznego modelu 3D osteosarcomy z komórkami nowotworowymi wymaga precyzyjnego uwzględnienia mikro-środowiska komórkowego, różnorodności komórkowej, a także czynników fizycznych i chemicznych, wpływających na rozwój nowotworu. Jest rzeczą oczywistą, że tego rodzaju prace realizowane być muszą w interdyscyplinarnych zespołach oraz przy zastosowaniu wielu złożonych technologii. Tworzenie modeli 3D osteosarcomy, zasiedlonych komórkami nowotworowymi, prowadzić może do lepszego zrozumienia patogenezы choroby, testowania potencjalnych leków i terapii celowanych oraz do rozwoju bardziej efektywnych strategii leczenia.

Doktorantka uczestniczy w pracach nad poszukiwaniem optymalnych rozwiązań w zakresie konstrukcji podłoży tkankowych, posiadających właściwości niezbędne do zastosowań w zakresie badań nad osteosarcomą. Badania te prowadzone są zarówno w zakresie poszukiwań materiałów do konstrukcji podłoży, ich parametrów dotyczących biomimetycznej wytrzymałości, analizy odpowiedzi komórkowej, jak i trwałości w środowisku biologicznym i wielu innych parametrów, niezbędnych do planowanych zastosowań. Celem zatem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej jest udowodnienie możliwości wytworzenia modelu tkanki nowotworowej i jego charakterystyka w powiązaniu z modelem zdrowej kości.

W roku 2013 pani mgr inż. Ewa Walejewska uzyskała licencjat na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, na kierunku Techniki Dentystyczne, a w roku 2016 ukończyła studia na Politechnice Warszawskiej w dziedzinie- Inżynieria Materiałowa- Biomateriały. W roku 2016 rozpoczęła studia doktoranckie na Politechnice Warszawskiej realizując prace pt. *Development of a three-dimensional tissue-engineered model of osteosarcoma*, pod kierunkiem prof. dr inż. Wojciecha Świążzkowskiego.

Efektom zaangażowania badawczego Doktorantki jest współautorstwo 5 publikacji w dobrze notowanych czasopismach z listy JCR, pięciu abstraktów w materiałach konferencyjnych, Doktorantka jest również współautorką zgłoszenia patentowego. Aktualnie

p. mgr inż. Ewa Walejewska realizuje projekt NCN (Preludium 20), uczestniczyła również w projekcie NCN, dotyczącym metod leczenia dużych ubytków kostnych u chorych onkologicznie i w trzech projektach z NCBiR, realizowanych we współpracy z partnerami z zagranicy (Ege University -Turcja , University of Zurich, Szwajcaria). Doktorantka odbyła trzy krótkoterminowe staże; Uniwersytet Medyczny w Warszawie -Zakład Transplantologii - Centralny Bank Tkanek, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku- Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji oraz Heriot Watt University, Institut of Biological Chemistry, Biophysics and Bioengineering.

Opinia merytoryczna

Przedstawiona do oceny dysertacja to przeszło 200-tu stronicowe opracowanie, do którego włączono spójny tematycznie zbiór publikacji, stanowiący podstawę o ubieganie się o stopień doktora. Obszerne opracowanie zatytułowane; *Development of a three-dimensional tissue-engineered model of osteosarcoma* rozpoczyna się od streszczeń w języku angielskim i polskim, po których następują rozdziały, dotyczące podstaw inżynierii tkankowej w zastosowaniach do regeneracji tkanki kostnej oraz zagadnień, związanych badaniami nad nowotworem kości w układach 2D i 3D w warunkach in vitro. Oba rozdziały powstały w oparciu o aktualne dane literaturowe i stanowią cenne kompendium wiedzy w zakresie nowoczesnej analizy możliwości terapeutycznych nowotworu kości, przy zastosowaniu inżynierii tkankowej. Po obszernym wprowadzeniu w tematykę inżynierii tkankowej w kontekście analizy guza nowotworowego, Doktorantka przedstawia hipotezę swojej pracy, która polega na stwierdzeniu, **że możliwe jest opracowanie hybrydowego modelu in vitro, zawierającego komponentę zdrowej tkanki kostnej oraz osteosarcomy, odwzorowującego warunki in vivo.**

W obszernym opracowaniu, obok wielu innych materiałów, Doktorantka przedstawia 2 artykuły, stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora, zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 186). Są to artykuły opublikowane w czasopismach z listy JCR, które w roku opublikowania były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami na podstawie art.267ust.2 pkt 2, powyższej ustawy, w których Doktorantka jest pierwszym autorem i w których zgodnie z oświadczeniami współautorów jej wkład w powstanie publikacji był dominujący.

Artykuł 1. pt.; *The effect of introduction of filament shift on degradation behaviour of PLGA- and PLCL-based scaffolds fabricated via additive manufacturing* został opublikowany w czasopiśmie Polymer Degradation and Stability, w roku 2020, aktualny IF czasopisma to 5.9, punkty ministeriale-100.

Artykuł 2. zatytułowany *Tuning Physical Properties of GelMA Hydrogels through Microarchitecture for Engineering Osteoid Tissue*, opublikowany został w czasopiśmie BiO-Macromolecules, IF-6.2, punkty ministerialne 140. (zaakceptowany w 2023, opublikowany 2024).

Pierwszy z artykułów (*The effect of introduction of filament shift on degradation behaviour of PLGA- and PLCL-based scaffolds fabricated via additive manufacturing*), dotyczy kluczowego aspektu w dziedzinie inżynierii tkankowej, a mianowicie badań nad parametrami, które mają decydujący wpływ na szybkość degradacji podłoża tkankowego. Problem ten analizowano na podstawie eksperymentów wykonanych w warunkach *in vitro*. Przedmiotem badań były dwie grupy poliestrów i ich kompozytów z TCP, które wytwarzano w metodzie precyzyjnego osadzania poprzez wyłaczanie materiału (PED) o odmiennej architekturze (włókna budujące podłoże tkankowe, ułożone z przesunięciem lub bez przesunięcia). Badano wpływ architektury podłoża na szybkość degradacji, a do analizy zmian zachodzących w dwóch typach podłoża zastosowano niezwykle bogaty zestaw narzędzi fizyko-chemii ciała stałego, co w efekcie przyniosło szereg cennych danych z punktu widzenia kontroli procesu degradacji poliestrowych podłoży tkankowych. Wyniki uzyskane przez autorów pracy doprowadziły do wskazania podłoży tkankowych o optymalnych parametrach materiałowych w kontekście planowanych badań, związanych z konstrukcją modelu tkanki kostnej.

Drugi z artykułów pt.; *Tuning Physical Properties of GelMA Hydrogels through Microarchitecture for Engineering Osteoid Tissue*, przedstawia dane, dotyczące badań nad wytworzeniem podłoża o parametrach odwzorujących niezmineralizowany osteoid, a zatem kolejną część w konstrukcji hybrydowego modelu osteosarcomy. Wybór materiału do konstrukcji osteoidu trzeba uznać za w pełni uzasadniony.

GelMA może być modyfikowany dodatkami, takimi jak białka, czynniki wzrostu i wiele innych, co pozwala uzyskać większą mimikrę struktury i funkcję tkanki. Autorzy opracowali szereg modyfikacji chemicznych i fizycznych żelu metakrylanowego GelMA w celu uzyskania materiałów, odpowiednich do konstrukcji podłoża tkankowego. W pracy przedstawiono oryginalny dwustopniowy proces żelowania w efekcie, którego otrzymano oczekiwane wyniki w zakresie właściwości mechanicznych, porowatości i adekwatnej do zastosowań odpowiedzi, w kontakcie z komórkami w warunkach *in vitro*. Badania *in vitro* prowadzono dla grupy materiałów, otrzymanych w różnych warunkach procesowych, między innymi analiza poziomu fosfatazy alkalicznej ALP, czyli czynnika wskazującego na różnicowanie komórek kostnych, pozwoliła na wskazanie podłoża o optymalnych właściwościach w aspekcie planowanych zastosowań. Biomateriały na bazie GelMA są szeroko wykorzystywane w inżynierii biomedycznej ze względu na ich bardzo dobre właściwości biologiczne, natomiast ich zastosowania w konstrukcji podłoży tkankowych są ograniczone, zwłaszcza przez ich niewystarczające właściwości mechaniczne, zatem wyniki zawarte w artykule przyczynić się mogą do znaczącego zniwelowania tego rodzaju ograniczeń.

Należy dodać, że Doktorantka dołącza do kopii tych dwóch omawianych artykułów, dodatkowe dane i w przypadku pierwszego z artykułów są to badania skaningowej kalorymetrii różnicowej oraz badania spektroskopii FTIR, dotyczące wszystkich czterech materiałów będących przedmiotem badań opisanych w artykule.

W przypadku drugiego z omawianych artykułów, dodatkowe dane obejmują wyniki badań biologicznych (przeżywalność komórek test Live/Dead, poziom znormalizowany poziom fosfatazy alkalicznej ALP/DNA), jak i dane stabilności strukturalnej czy badania spektroskopowe i termogawimetryczne analizowanych układów, wytwarzanych na bazie GelMA.

Opracowanie przedstawione przez Doktorantkę ma nietypową formę, komentarz, jaki dołącza się zazwyczaj do cyklu jednotematycznych publikacji, został wzbogacony o dwa nieopublikowane artykuły, które są związane z tematem dysertacji i dostarczają kluczowych wyników w aspekcie weryfikowania tezy pracy. Wiodący udział Doktorantki w opracowaniu tych dwóch artykułów został potwierdzony odpowiednimi oświadczeniami. Pierwszy z artykułów zatytułowany *Navigating osteo-angiogenic dynamics by the combinatory effect of filament shift introduction in TCP-loaded PLGA and PCL scaffolds guided by MSC-enriched co-culturing conditions*, został wysłany do czasopisma ASC Biomaterials&Engineering i oczekuje na akceptację wydawcy. Artykuł ten przedstawia bardzo interesujące wyniki badań biologicznych, złożonych układów komórkowych (MSC, hFOB, HUVEC), analizowanych w kontakcie z podłożami tkankowymi na bazie resorbowalnych poliestrów i fosforanu wapnia, wytworzonych w różnych układach architektonicznych. Reakcja komórek korelowana jest z szeroką analizą właściwości chemicznych i fizycznych, poszczególnych podłoży tkankowych. Wyniki badań przedstawione w artykule są kontynuacją prac przedstawionych w artykule - *The effect of introduction of filament shift on degradation behaviour of PLGA- and PLCL-based scaffolds fabricated via additive manufacturing*.

Artykuł pt.; *Simplified 3D model for invasion Testing: Complexified interactions between osteosarcoma cells and bone-mimicking PLGA/20TCP scaffolds* to praca, która podobnie jak poprzednia, nie została jeszcze opublikowana. Praca ta opiera się na wynikach artykułów zawartych w opracowaniu przedstawionym przez Doktorantkę i jest kluczowa z punktu widzenia potwierdzenia tezy doktoratu p. mgr inż. Ewy Walejewskiej, gdyż wskazuje jednoznacznie, że model nowotworu tkanki kostnej został opracowany i zweryfikowany badaniami biologicznymi. Należy dodać, że badania nad połączonymi modelami tkanki nowotworowej i zdrowej tkanki kostnej doprowadziły do szeregu ważnych wniosków w zakresie zachowania komórek nowotworowych, wykazano między innymi, że ich inwazja blokowana była przez obecności zróżnicowanych osteogennie komórek MSC.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że model opracowany w badaniach przedstawionych w dysertacji p. mgr inż. Ewy Walejewskiej stanowi wartościowy układ, o wysokim stopniu złożoności, łączący w sobie konstrukt zdrowej i nowotworowej kości, na podstawie którego możliwe będą dalsze badania nad osteosarcomą, prowadzące do opracowania nowych, skuteczniejszych niż dotychczasowe metod terapeutycznych.

Niemniej jednak należy zwrócić uwagę, że wartość naukowa wyników badań, zawartych w obszernym opracowaniu, przedstawionym przez Doktorantkę dotyczy, nie tylko złożonego układu jakim jest model tkanki kostnej zdrowej w połączeniu z nowotworową, ale również związana jest z oryginalnymi rozwiązaniami, dotyczącymi podłoży każdej z tkanek

osobno, czyli kompozytu poliestry resorbowalne/TCP oraz układów na bazie GelMA, otrzymywanych w procesie dwustopniowego żelowania.

Analiza obszernego opracowania przedstawionego przez Doktorantkę jednoznacznie wskazuje, że jest ona osoba posiadającą gruntowną wiedzę w dziedzinie naukowej, w ramach której prowadzi badania nad modelami tkanki nowotworowej. Treść materiałów przedstawionych do oceny w pełni potwierdza, że p. mgr inż. Ewa Walejewska posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych, w tym prawidłowego doboru metod badawczych służących do zweryfikowania hipotezy sformułowanej w początkowej części pracy. Na podstawie oceny jedno-tematycznego cyklu publikacji, przedstawionego przez Doktorantkę oraz na podstawie szeregu cennych wyników badań, przedstawionych w dysertacji p. mgr inż. Ewy Walejewskej stwierdzam, że jest ona aktywnym badaczem, której prace stanowią ważny wkład w uprawianą przez nią dziedzinę wiedzy.

Wniosek końcowy.

W posumowaniu stwierdzam, że recenzowana przeze mnie praca pt. *Development of a three-dimensional tissue-engineered model of osteosarcoma* spełnia warunki Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dn. 20 lipca 2018 (Dz.Uz 2018 poz.1668) (Uchwała nr 321/L/2023 Senatu Politechniki Warszawskiej z dnia 29 marca 2023) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny -Inżynieria Materiałowa, Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie pani mgr inż. Ewy Walejewskej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

