

Abstract of PhD Thesis

„Three-dimensional tissue scaffolds fabrication for Osteochondral Tissue Engineering”

Osteoarthritis is a chronic disease that often occurs in patients affected by untreated traumatic cartilage and bone lesions. According to the latest United Nations statistics, more than 130 million people worldwide will suffer from it by 2050. Despite the availability of many surgical procedures in osteochondral lesion treatment, most of them are insufficient due to disadvantages such as transplant rejection. The lack of effective treatments for osteochondral tissue can be partly attributed to the structural complexity of its components, including non-calcified cartilage (i.e. *hyaline*), calcified cartilage and subchondral bone. In order to emulate the zonal character of this tissue, each region should be carefully developed. Osteochondral tissue engineering strategies are generally classified into single-phase (monophasic), two-phase (biphasic) and three-phase (triphasic) scaffolds. While monophasic scaffolds related to single tissue (for cartilage or bone in general) are well documented, bi- and tri-phasic models are still largely unexplored as a novel approach.

The main purpose of this doctoral dissertation was the fabrication and characterization of novel scaffolds able to recapitulate the complex structure and properties of osteochondral tissue. To achieve this goal, bioprinting and fused deposition modeling (FDM) techniques were utilized to obtain non-calcified cartilage, calcified cartilage and subchondral bone scaffolds then assembled in a final triphasic construct.

In order to recapitulate the structure and functions of soft, elastic, non-calcified cartilage tissue, three-dimensional scaffolds based on sodium alginate reinforced with short polylactide (PLA) fibers were fabricated. In this study, 3D bioprinting technique and a spray system for hydrogel crosslinking were combined. The comprehensive characterization of the developed scaffolds indicates that the inclusion of fillers improves the mechanical properties of the scaffolds and reduces their swelling. In addition, cellular studies using cartilage cells (chondrocytes) embedded in the hydrogel-based scaffold have demonstrated that such 3D cellular substrates represent a valid platform for cartilage tissue engineering.

The next part of this doctoral dissertation was the development of a substitute for calcified cartilage tissue. 3D scaffolds based on sodium alginate and methacrylate gelatin (GelMA) combined with β -tricalcium phosphate (TCP) ceramic particles were fabricated using an innovative deposition system based on a coaxial needle extruder. The developed scaffolds were comprehensively characterized and *in vitro* studies were assessed to evaluate the ability of human bone marrow mesenchymal stem cells (BM-hMSC) to differentiate into hypertrophic chondrocytes, as typically occurs in native calcified cartilage regions. The results obtained using RT-qPCR and immunocytochemical fluorescence indicate that the addition of TCP particles to the bioink not only causes a greater expression of typically occurred in cartilage extracellular matrix proteins and proteoglycans (collagen type II, X and aggrecan), but above all, alkaline phosphatase expression (ALPL), an essential ingredient for nucleating mineral growth such as calcium and phosphorus.

The following part of the doctoral dissertation concerns hard and stiff subchondral bone. From the materials engineering point of view, polyesters such as polycaprolactone are promising synthetic biomaterials for bone regeneration. To fabricate the porous structure of a bone substitute, fused deposition modelling (FDM) was implemented. Generally, in order to improve the osteoinductivity of 3D synthetic scaffolds, a blend of polymers or a surface modification treatment are used. In this frame, an effective method of "solvent treatment" was developed, involving controlled dissolution of 3D scaffold's surface, that results in the production of a highly porous microstructure. The evaluation of the physico-chemical

properties of such scaffolds and *in vitro* investigation of osteogenically differentiated human placenta-derived mesenchymal stem cells seeded on polyester-based fabricated scaffolds confirmed their potential as an implant for subchondral bone.

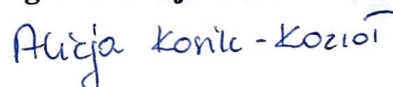
The last part of the doctoral dissertation regards the fabrication and characterization of a scaffold for the regeneration of osteochondral tissue. As a final goal, non-calcified cartilage, calcified cartilage and subchondral bone were connected to each other to form the triphasic construct. The developed hybrid construct was characterized providing a proper structure and specific mechanical properties, indicating its potential application as a substitute for osteochondral tissue.

This doctoral dissertation shows an innovative approach for the fabrication of various types of tissue substitutes, from viscoelastic cartilage to rigid bone, herein combined into a hybrid scaffold. To achieve the set goal, natural and synthetic biomaterials were selected, advanced techniques for the fabrication of three-dimensional scaffolds were used and many material characterization methods have been involved. The thesis explores the wide possibilities that contemporary Materials Engineering brings to Tissue Engineering and Regenerative Medicine, proposing solutions for the global problem of osteochondral tissue regeneration.

dr hab. inż. Wojciech Świążkowski, prof. PW



mgr inż. Alicja Kosik-Kozioł



Streszczenie rozprawy doktorskiej

„Wytwarzanie trójwymiarowych rusztowań tkankowych do regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych”

Choroba zwyrodnieniowa stawów (Osteoartroza) jest przewlekłą chorobą, która często rozwija się u pacjentów dotkniętych nieleczonymi urazowymi zmianami chrzęstno-kostnymi. Według najnowszych danych statystycznych Organizacji Narodów Zjednoczonych (ONZ), do 2050 roku, ponad 130 milionów ludzi na całym świecie będzie cierpieć na to schorzenie. Pomimo dostępności wielu chirurgicznych metod leczenia zmian chrzęstno-kostnych, stosowanie ich jest ograniczone ze względu na występujące komplikacje takie jak odrzucenie przeszczepu. Brak skutecznych metod leczenia tkanki chrzęstno-kostnej można częściowo przypisać jej złożoności strukturalnej. Charakteryzuje się ona wielowarstwową strukturą, zawierającą chrząstkę niezwapniałą (zwaną również szklistą), chrząstkę zwapniałą i kość podchrzęstną. W celu odwzorowania strefowego charakteru tej tkanki, każdy obszar powinien być precyzyjnie opracowany. Inżynieryjne strategie regeneracji tkanki chrzęstno-kostnej są ogólnie klasyfikowane do rusztowań jednofazowych, dwufazowych i trójfazowych. Podczas, gdy jednofazowe rusztowania dotyczące pojedynczej tkanki (głównie chrząstki lub kości) są dobrze udokumentowane, modele dwu- i trójfazowe są nadal w dużej mierze innowacyjnym podejściem.

Głównym celem tej rozprawy doktorskiej jest wytworzenie i scharakteryzowanie nowatorskich trójwymiarowych struktur odwzorowujących kompleksową strukturę i właściwości tkanki chrzęstno-kostnej. W celu osiągnięcia wyznaczonego celu zastosowano techniki biodrukowania 3D i osadzania topionego materiału (FDM) wytwarzając substytuty tkanek chrzęstnych: niezwapniałej i zwapniałej oraz kości podchrzęstnej, następnie złożonych w trójfazowe rusztowanie.

W celu wytworzenia rusztowania odwzorowującego strukturę i funkcje miękkiej i elastycznej, niezwapniałej tkanki chrzęstnej, wytworzono trójwymiarowe rusztowania na bazie alginianu sodu wzmocnionego krótkimi włóknami polilaktydowymi (PLA). W tych badaniach zastosowano technikę biodrukowania 3D połączoną z natryskowym systemem sieciowania hydrożeli. Kompleksowa charakteryzacja wytworzonych rusztowań wskazuje, że dodatek wypełniaczy poprawia właściwości mechaniczne rusztowań i zmniejsza stopień ich pęcznienia. Ponadto, przeprowadzone badania komórkowe z wykorzystaniem komórek chrzęstnych (chondrocytów) osadzonych w hydrożelowym rusztowaniu, wykazały, że takie trójwymiarowe podłoża komórkowe stanowią odpowiednią platformę dla inżynierii tkanki chrzęstnej.

Kolejną częścią rozprawy doktorskiej było opracowanie zwapniałego substytutu tkanki chrzęstnej. Trójwymiarowe rusztowania oparte na hydrożelach, takich jak alginian sodu i zmetakrylowana żelatyna (GelMA) w połączeniu z ceramicznymi cząstkami fosforanu β -trójwapniowego (TCP), zostały wytworzone w procesie biodrukowania przy użyciu współosiowego systemu igieł do sieciowania hydrożeli. Wytworzone rusztowania zostały kompleksowo scharakteryzowane, a przeprowadzone badania *in vitro* oceniły zdolność różnicowania ludzkich komórek macierzystych szpiku kostnego (BM-hMSC) w hipertroficzne chondrocyty powszechnie występujące w zwapniałym regionie natywnej chrząstki. Wyniki uzyskane przy użyciu RT-qPCR i fluorescencji immunocytochemicznej wskazują, że dodanie cząstek TCP do biotuszu powoduje nie tylko większą ekspresję charakterystycznych dla chrząstki białek macierzy zewnątrzkomórkowej i proteoglikanu (kolagen typu II, X i agrekan), ale przede wszystkim ekspresję fosfatazy alkalicznej (ALPL), niezbędnego składnika do zarodkowania minerałów, takich jak wapń i fosfor.

Kolejna część rozprawy doktorskiej dotyczy twardej i sztywnej kości podchrzęstnej. Z punktu widzenia inżynierii materiałowej poliestry takie jak polikaprolakton są obiecującymi biomateriałami do regeneracji zmian kostnych. Drukowanie metodą osadzania topionego materiału (FDM) zostało użyte do wytworzenia porowatej struktury substytutu kości. Zasadniczo, w celu poprawy osteoinduktywności inżynierskich rusztowań, powszechnie stosuje się kompozyty polimerowe lub różne metody obróbki powierzchni. W niniejszej pracy opracowano skuteczną metodę „obróbki rozpuszczalnikiem” polegającej na kontrolowanym rozpuszczaniu powierzchni rusztowań 3D i w efekcie wytworzenia wysoce porowatej mikrostruktury. Ocena właściwości fizyko-chemicznych rusztowań i badania *in vitro* z zastosowaniem osteogenicznie różnicowanych komórek macierzystych pochodzących z łożyska, osadzonych na zmodyfikowanych rusztowaniach potwierdziły duży potencjał zastosowania opracowanych rusztowań do regeneracji części kości podchrzęstnej.

Ostatnia część rozprawy doktorskiej dotyczy wytworzenia i scharakteryzowania trójfazowego rusztowania do regeneracji tkanki chrzęstno-kostnej. Końcowym celem pracy było wytworzenie trójfazowego rusztowania składającego się z trzech opracowanych rusztowań imitujących odpowiednio tkanki niezwapniałą chrzęstną, zwapniałą chrzęstną oraz kość podchrzęstną. Opracowane hybrydowe rusztowanie charakteryzuje się właściwą strukturą i odpowiednimi właściwościami mechanicznymi, wskazując na jego potencjalne możliwości zastosowania jako substytut tkanki chrzęstno-kostnej.

Niniejsza rozprawa doktorska przedstawia nowatorskie podejście wytwarzania substytutów różnych typów tkanek, od lepkosprężystej chrząstki po sztywną kość, które zostały połączone w hybrydowym rusztowaniu. W celu osiągnięcia wyznaczonego celu dobrano naturalne oraz syntetyczne biomateriały, zastosowano zaawansowane techniki wytwarzania trójwymiarowych rusztowań oraz wykorzystano wiele metod charakteryzowania materiałów. Rozprawa wskazuje na szerokie możliwości, które wnosi współczesna Inżynieria Materiałowa do Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej, proponując rozwiązania dla globalnego problemu regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych.

dr hab. inż. Wojciech Świąszkowski, prof. PW



mgr inż. Alicja Kosik-Kozioł

