

WNIOSEK PROJEKTU DOKTORSKIEGO
Szkoła Doktorska Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu

IMIĘ I NAZWISKO AUTORA PROJEKTU	Maciej Gagat
AFILIACJA AUTORA PROJEKTU (jednostka organizacyjna, telefon kontaktowy, adres e-mail)	Katedra Histologii i Embriologii, 52 585 3725, mgagat@cm.umk.pl
DYSCYPLINA NAUKOWA, W RAMACH KTÓREJ PROJEKT BĘDZIE REALIZOWANY (zaznaczyć właściwą)	☐ NAUKI FARMACEUTYCZNE ☒ NAUKI MEDYCZNE ☐ NAUKI O ZDROWIU

CZĘŚĆ A:
OPIS PROJEKTU

1. TEMAT PROJEKTU:
Ocena potencjału chondrogennego komórek progenitorowych pochodzących z chrzęstnej przegrody nosowej oraz ich odpowiedzi na komercyjnie dostępne kleje tkankowe i uszczelniacze fibrynowe w kontekście potencjalnego zastosowania w regeneracji chrząstki stawowej
2. STRESZCZENIE PROJEKTU (max. 1000 znaków ze spacjami):
Projekt dotyczy oceny potencjału chondrogennego komórek progenitorowych pozyskiwanych z chrzęstnej przegrody nosowej oraz ich odpowiedzi na komercyjnie dostępne kleje tkankowe i uszczelniacze fibrynowe w kontekście regeneracji chrząstki stawowej. Badania obejmą izolację i charakterystykę komórek, analizę ich przeżycia, proliferacji, adhezji oraz zdolności do różnicowania chondrogennego w warunkach in vitro w układach 2D i 3D, a także ocenę ich zachowania w modelu ex vivo osteochondralnych eksplantów. Projekt pozwoli określić, czy chrzęstna przegrody nosowej może stanowić wartościowe źródło komórek dla inżynierii tkankowej chrząstki oraz czy stosowane klinicznie materiały fibrynowe jedynie stabilizują implant, czy również aktywnie modulują mikrośrodowisko regeneracji.
3. CEL NAUKOWY PROJEKTU I ZNACZENIE PODJĘTEGO PROBLEMU BADAWCZEGO (max. 3000 znaków ze spacjami):
Uszkodzenia chrząstki stawowej stanowią istotny problem kliniczny ze względu na bardzo ograniczoną zdolność tej tkanki do samoistnej regeneracji. Pomimo rozwoju nowoczesnych metod leczenia, takich jak techniki stymulacji szpiku kostnego, przeszczepy chrzęstno-kostne, implantacja chondrocytów oraz strategie oparte na biomateriałach, nadal nie uzyskano rozwiązania pozwalającego na przewidywalne odtworzenie trwałej chrząstki szklistej o właściwościach zbliżonych do tkanki natywnej. Jednocześnie w

chirurgii naprawczej chrząstki stosowane są komercyjnie dostępne kleje i uszczelniacze fibrynowe, przede wszystkim jako materiały pomocnicze służące do stabilizacji implantów, błon i materiału komórkowego. Badania mechaniczne wskazują jednak, że właściwości adhezyjne dostępnych komercyjnie uszczelnaczy fibrynowych, takich jak Tisseel i Vistaseal, mogą być niewystarczające dla optymalnej stabilizacji implantów stosowanych w naprawie chrząstki, co uzasadnia potrzebę ich dalszej oceny również w aspekcie biologicznym.

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie budzą komórki pochodzące z okolicy przegrody nosowej jako źródło komórek dla inżynierii tkankowej chrząstki. Najsilniejsze dostępne dowody dotyczą przede wszystkim chondrocytów przegrody nosowej, dla których wykazano wysoki potencjał proliferacyjny oraz zdolność do tworzenia tkanki chrzęstnej. W badaniach przedklinicznych wykazano, że ludzkie chondrocyty dojrzałej chrząstki szklistej przegrody nosowej mogą ulegać samoodnowie i adaptować się do środowiska stawowego, a strategie oparte na tych komórkach zostały następnie rozwinięte do badań klinicznych, obejmujących badanie typu first-in-human u pacjentów z ubytkami chrząstki stawowej kolana oraz późniejsze badania potwierdzające kliniczną wykonalność i skuteczność tej koncepcji. Doniesienia literaturowe wskazują również, że chondrocyty przegrody nosowej mogą znaleźć zastosowanie także w bardziej niesprzyjającym, zwyrodnieniowo zmienionym środowisku stawowym.

Równocześnie należy podkreślić, że opisane wyżej dane przedkliniczne i kliniczne odnoszą się głównie do chondrocytów przegrody nosowej, natomiast ochrzęstna przegrody nosowej jest obecnie rozpatrywana jako potencjalne, nadal niewystarczająco scharakteryzowane źródło komórek progenitorowych o właściwościach chondrogennych. Ochrzęstna pełni funkcję biologicznie aktywnej niszy zawierającej komórki progenitorowe uczestniczące we wzroście, utrzymaniu i regeneracji chrząstki, a współczesne opracowania dotyczące przegrody nosowej podkreślają obecność populacji komórkowych o cechach progenitorowych w tej okolicy. Właśnie ta luka poznawcza stanowi jedno z głównych uzasadnień projektu.

Celem naukowym projektu jest izolacja i charakterystyka komórek progenitorowych pochodzących z ochrzęstnej przegrody nosowej oraz ocena wpływu komercyjnie dostępnych klejów i uszczelnaczy fibrynowych na ich przeżycie, proliferację, adhezję, utrzymanie fenotypu oraz różnicowanie chondrogenne w warunkach in vitro i ex vivo. Projekt ma odpowiedzieć na pytanie, czy materiały fibrynowe stosowane obecnie w praktyce chirurgicznej mogą pełnić nie tylko funkcję technicznego uszczelnacza, ale również aktywnie modulować mikrośrodowisko komórkowe w sposób sprzyjający lub niekorzystny dla regeneracji chrząstki stawowej. Uzyskane wyniki pozwolą ocenić przydatność komórek pochodzących z ochrzęstnej przegrody nosowej jako źródła komórek dla inżynierii tkankowej chrząstki oraz wskażą, które z analizowanych produktów fibrynowych wykazują największą biogodność i zdolność wspierania chondrogenyzy.

4. KONCEPCJA I PLAN BADAŃ Z UWZGLĘDNIENIEM METODYKI (max. 4000 znaków ze spacjami):

Projekt będzie realizowany etapowo. W pierwszym etapie zostanie opracowana procedura pozyskiwania materiału biologicznego oraz izolacji komórek progenitorowych z ochrzęstnej przegrody nosowej. Uzyskane komórki zostaną następnie scharakteryzowane pod względem morfologii, zdolności proliferacyjnej oraz ekspresji markerów związanych z fenotypem progenitorowym i chondrogennym. Założeniem projektu jest wykorzystanie ochrzęstnej jako niszy komórek progenitorowych, zgodnie z danymi wskazującymi, że tkanka ta odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy chrząstki i jej regeneracji. Dodatkowym uzasadnieniem jest obecność doniesień wskazujących na potencjał regeneracyjny populacji komórkowych związanych z przegrodą nosową oraz możliwość ich wykorzystania poza środowiskiem anatomicznym nosa, w tym w naprawie chrząstki stawowej.

W drugim etapie zostaną wybrane komercyjnie dostępne kleje i uszczelniacze fibrynowe stosowane w praktyce chirurgicznej. Dobór produktów będzie oparty na ich dostępności klinicznej oraz potencjalnej przydatności w procedurach naprawy chrząstki, gdzie materiały fibrynowe wykorzystywane są jako nośniki komórek, stabilizatory fragmentów chrzęstnych lub środki wspomagające utrzymanie implantów w obrębie ubytku. Szczególna uwaga zostanie zwrócona na preparaty stosowane lub oceniane w kontekście

naprawy chrząstki stawowej. Dotychczasowe wyniki wskazują, że dostępne uszczelniacze fibrynowe nie są materiałami idealnie dostosowanymi do zastosowań chrząstkowych, co stwarza potrzebę dokładnego porównania ich wpływu na zachowanie komórek progenitorowych.

W trzecim etapie komórki progenitorowe pochodzące z ochrząstnej przegrody nosowej będą hodowane w kontakcie z wybranymi materiałami fibrynowymi w układach 2D i 3D. Model 2D pozwoli na ocenę bezpośredniej odpowiedzi komórek na powierzchnię materiału, natomiast model 3D umożliwi analizę zachowania komórek osadzonych w przestrzennej macierzy przypominającej warunki przyszłego zastosowania regeneracyjnego. Ocenie podlegać będą: żywotność komórek, proliferacja, zdolność adhezji, a także potencjał różnicowania chondrogennego. Analiza obejmie ekspresję markerów charakterystycznych dla chondrogenyzy, w szczególności SOX9, COL2A1 i ACAN, oraz markerów mogących wskazywać na niepożądane włóknienie lub hipertrofię, takich jak COL1A1, COL10A1 i MMP13. Równolegle oceniana będzie zdolność komórek do wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej typowej dla chrząstki, z wykorzystaniem metod histochemicznych, immunofluorescencyjnych oraz ilościowych oznaczeń glikozaminoglikanów. Takie podejście odpowiada aktualnym standardom badań nad biomateriałami i inżynierią tkankową chrząstki.

Dodatkowo projekt zostanie rozszerzony o model *ex vivo* regeneracji chrząstki stawowej z wykorzystaniem osteochondralnych eksplantów. W standaryzowanych eksplantach osteochondralnych zostanie wykonany ubytek chrząstki stawowej o ściśle określonych wymiarach, a następnie ubytek ten będzie wypełniany wybranym uszczelniaczem fibrynowym, z dodatkiem lub bez dodatku komórek progenitorowych pochodzących z ochrząstnej przegrody nosowej. Model ten umożliwi ocenę zachowania materiału i komórek w warunkach bardziej zbliżonych do rzeczywistego środowiska tkanki stawowej niż klasyczna hodowla komórkowa. Eksplantaty osteochondralne są obecnie uznawane za cenne narzędzie pośrednie między prostym modelem *in vitro* a badaniami *in vivo*, ponieważ pozwalają badać retencję materiału w obrębie ubytku, integrację z tkanką gospodarza oraz jakość nowo powstającej macierzy.

W modelu *ex vivo* planuje się porównanie co najmniej następujących grup badawczych: ubytek niewypełniony, ubytek wypełniony samym uszczelniaczem fibrynowym oraz ubytek wypełniony uszczelniaczem zawierającym komórki progenitorowe z ochrząstnej przegrody nosowej; analogiczne grupy zostaną przygotowane dla każdego analizowanego produktu fibrynowego. Ocenie podlegać będą: przeżycie komórek, stopień wypełnienia ubytku, utrzymanie materiału w miejscu implantacji, ekspresja markerów chondrogenyzy, odkładanie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz jakość integracji nowo tworzonej tkanki z otaczającą chrząstką i warstwą podchrząstną. Rozszerzenie projektu o ten etap zwiększy jego wartość translacyjną i umożliwi bardziej wiarygodną ocenę potencjału badanych komórek i biomateriałów w regeneracji chrząstki stawowej.

5. SPODZIEWANE ZNACZENIE WYNIKÓW BADAŃ Z OKREŚLENIEM WPLYWU NA ROZWÓJ DYSCYPLINY (max. 1500 znaków ze spacjami):

Spodziewanym rezultatem projektu będzie wykazanie, czy ochrząstna przegrody nosowej może stanowić wartościowe źródło komórek progenitorowych o właściwościach chondrogennych, przydatnych w badaniach nad regeneracją chrząstki stawowej. Wyniki pozwolą określić, w jakim stopniu komercyjnie dostępne kleje i uszczelniacze fibrynowe wpływają na przeżycie, fenotyp i różnicowanie tych komórek, a także czy mogą wspierać tworzenie macierzy charakterystycznej dla chrząstki szklistej. Równocześnie projekt umożliwi weryfikację, czy stosowane klinicznie materiały fibrynowe są jedynie biernym środkiem stabilizującym, czy też aktywnie kształtują odpowiedź komórkową w miejscu regeneracji.

Znaczenie projektu ma charakter zarówno poznawczy, jak i aplikacyjny. Od strony poznawczej badania przyczynią się do lepszego zrozumienia biologicznej roli ochrząstnej jako źródła komórek progenitorowych oraz znaczenia mikrośrodowiska fibrynowego w procesie chondrogenyzy. Od strony aplikacyjnej wyniki mogą stanowić podstawę do bardziej racjonalnego doboru materiałów pomocniczych stosowanych w procedurach naprawy chrząstki oraz do projektowania nowych strategii leczenia wykorzystujących komórki pochodzące z przegrody nosowej. Uwzględnienie modelu *ex vivo* zwiększa szansę, że uzyskane obserwacje będą miały znaczenie translacyjne i staną się punktem wyjścia do dalszych badań przedklinicznych oraz rozwoju nowoczesnych metod regeneracji chrząstki stawowej.

6. PLANOWANA FORMA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ



MANUSKRYPT – tradycyjna forma rozprawy nieopublikowanej



CYKL PUBLIKACJI – spójny tematycznie zbiór opublikowanych artykułów



TRYB HYBRYDOWY – spójny tematycznie zbiór opublikowanych artykułów i nieopublikowanych manuskryptów

PROJECT DESCRIPTION

1. TITLE OF THE PROJECT (max. 1000 characters with spaces):

Evaluation of the chondrogenic potential of progenitor cells derived from nasal septum perichondrium and their response to commercially available tissue adhesives and fibrin sealants in the context of their potential application in articular cartilage regeneration

2. PROJECT SUMMARY (max. 1000 characters with spaces):

The project concerns the evaluation of the chondrogenic potential of progenitor cells isolated from the perichondrium of the nasal septum and their response to commercially available tissue adhesives and fibrin sealants in the context of articular cartilage regeneration. The study will include the isolation and characterization of these cells, the analysis of their survival, proliferation, adhesion, and capacity for chondrogenic differentiation under in vitro conditions in 2D and 3D systems, as well as the assessment of their behavior in an ex vivo model of osteochondral explants. The project will determine whether the perichondrium of the nasal septum may serve as a valuable cell source for cartilage tissue engineering and whether clinically used fibrin materials act only as implant stabilizers or also actively modulate the regenerative microenvironment.

3. RESEARCH OBJECTIVE AND SIGNIFICANCE OF THE RESEARCH PROBLEM ADDRESSED: (max. 3000 characters with spaces):

Articular cartilage injuries constitute a significant clinical problem due to the very limited intrinsic regenerative capacity of this tissue. Despite the development of modern treatment methods, such as bone marrow stimulation techniques, osteochondral grafts, chondrocyte implantation, and biomaterial-based strategies, no solution has yet been achieved that allows the predictable restoration of durable hyaline cartilage with properties similar to native tissue. At the same time, commercially available fibrin glues and sealants are used in cartilage repair surgery, primarily as auxiliary materials for the stabilization of implants, membranes, and cellular material. Mechanical studies indicate, however, that the adhesive properties of commercially available fibrin sealants such as Tisseel and Vistaseal may be insufficient for the optimal stabilization of implants used in cartilage repair, which justifies the need for their further evaluation also in the biological aspect.

In recent years, increasing interest has focused on cells derived from the nasal septum region as a cell source for cartilage tissue engineering. The strongest available evidence concerns primarily nasal septum chondrocytes, for which a high proliferative potential and the ability to form cartilage tissue have been demonstrated. Preclinical studies have shown that human chondrocytes of mature hyaline cartilage of the nasal septum can undergo self-renewal and adapt to the articular environment, and strategies based on these cells were subsequently developed into clinical studies, including a first-in-human trial in patients with articular cartilage defects of the knee joint and later studies confirming the clinical feasibility and

efficacy of this concept. Literature reports also indicate that nasal septum chondrocytes may be applicable also in the more unfavorable, degeneratively altered articular environment.

At the same time, it should be emphasized that the preclinical and clinical data described above refer mainly to nasal septum chondrocytes, whereas the perichondrium of the nasal septum is currently being considered as a potential, still insufficiently characterized source of progenitor cells with chondrogenic properties. The perichondrium serves as a biologically active niche containing progenitor cells involved in the growth, maintenance, and regeneration of cartilage, and contemporary studies concerning the nasal septum emphasize the presence of cell populations with progenitor features in this region. It is precisely this knowledge gap that constitutes one of the main justifications for the project.

The scientific objective of the project is the isolation and characterization of progenitor cells derived from the perichondrium of the nasal septum and the assessment of the effect of commercially available fibrin glues and sealants on their survival, proliferation, adhesion, phenotype maintenance, and chondrogenic differentiation under in vitro and ex vivo conditions. The project is intended to answer the question of whether fibrin materials currently used in surgical practice may serve not only as a technical sealant, but also actively modulate the cellular microenvironment in a way that is favorable or unfavorable for articular cartilage regeneration. The obtained results will make it possible to assess the usefulness of cells derived from the perichondrium of the nasal septum as a cell source for cartilage tissue engineering and will indicate which of the analyzed fibrin products show the greatest biocompatibility and ability to support chondrogenesis.

4. CONCEPT, PLAN AND METHODOLOGY OF THE RESEARCH PROJECT (max. 4000 characters with spaces):

The project will be carried out in stages. In the first stage, a procedure for obtaining biological material and isolating progenitor cells from the perichondrium of the nasal septum will be developed. The obtained cells will then be characterized in terms of morphology, proliferative capacity, and the expression of markers associated with the progenitor and chondrogenic phenotype. The project is based on the assumption that the perichondrium can be used as a progenitor cell niche, in accordance with data indicating that this tissue plays an important role in maintaining cartilage homeostasis and regeneration. Additional justification is provided by the presence of reports indicating the regenerative potential of cell populations associated with the nasal septum and the possibility of their use outside the anatomical environment of the nose, including in articular cartilage repair.

In the second stage, commercially available fibrin glues and sealants used in surgical practice will be selected. The choice of products will be based on their clinical availability and their potential usefulness in cartilage repair procedures, where fibrin materials are used as cell carriers, stabilizers of cartilage fragments, or agents supporting the retention of implants within the defect. Particular attention will be paid to preparations used or evaluated in the context of articular cartilage repair. Existing results indicate that available fibrin sealants are not materials ideally adapted to cartilage applications, which creates the need for a detailed comparison of their influence on progenitor cell behavior.

In the third stage, progenitor cells derived from the perichondrium of the nasal septum will be cultured in contact with selected fibrin materials in 2D and 3D systems. The 2D model will allow the assessment of the direct cellular response to the material surface, whereas the 3D model will enable the analysis of the behavior of cells embedded in a spatial matrix resembling the conditions of future regenerative application. The following parameters will be assessed: cell viability, proliferation, adhesion capacity, as well as chondrogenic differentiation potential. The analysis will include the expression of markers characteristic of chondrogenesis, in particular SOX9, COL2A1, and ACAN, as well as markers that may indicate undesirable fibrosis or hypertrophy, such as COL1A1, COL10A1, and MMP13. In parallel, the ability of the cells to produce extracellular matrix typical of cartilage will be evaluated using histochemical, immunofluorescence, and quantitative glycosaminoglycan assays. Such an approach corresponds to current standards in biomaterials and cartilage tissue engineering research.

Additionally, the project will be extended by an ex vivo model of articular cartilage regeneration using osteochondral explants. In standardized osteochondral explants, an articular cartilage defect of strictly defined dimensions will be created, and this defect will then be filled with the selected fibrin sealant, with or without the addition of progenitor cells derived from the perichondrium of the nasal septum. This model will allow the assessment of the behavior of the material and cells under conditions more closely resembling the actual environment of articular tissue than classical cell culture. Osteochondral explants are currently recognized as a valuable intermediate tool between a simple in vitro model and in vivo studies, because they allow the investigation of material retention within the defect, integration with host tissue, and the quality of the newly formed matrix.

In the ex vivo model, it is planned to compare at least the following experimental groups: unfilled defect, defect filled with fibrin sealant alone, and defect filled with sealant containing progenitor cells from the perichondrium of the nasal septum; analogous groups will be prepared for each analyzed fibrin product. The following will be assessed: cell survival, degree of defect filling, maintenance of the material at the implantation site, expression of chondrogenesis markers, deposition of extracellular matrix, and the quality of integration of the newly formed tissue with the surrounding cartilage and subchondral layer. Extending the project by this stage will increase its translational value and enable a more reliable assessment of the potential of the studied cells and biomaterials in articular cartilage regeneration.

5. EXPECTED SIGNIFICANCE OF RESEARCH RESULTS AND IMPACT ON THE DEVELOPMENT OF THE DISCIPLINE (max. 1500 characters with spaces):

The expected outcome of the project will be to demonstrate whether the perichondrium of the nasal septum may constitute a valuable source of progenitor cells with chondrogenic properties, useful in research on articular cartilage regeneration. The results will make it possible to determine to what extent commercially available fibrin glues and sealants affect the survival, phenotype, and differentiation of these cells, as well as whether they can support the formation of a matrix characteristic of hyaline cartilage. At the same time, the project will enable verification of whether clinically used fibrin materials are merely passive stabilizing agents, or whether they actively shape the cellular response at the regeneration site.

The significance of the project is both cognitive and applicational. From the cognitive perspective, the research will contribute to a better understanding of the biological role of the perichondrium as a source of progenitor cells and of the significance of the fibrin microenvironment in the process of chondrogenesis. From the applicational perspective, the results may provide a basis for a more rational selection of auxiliary materials used in cartilage repair procedures and for the design of new treatment strategies using cells derived from the nasal septum. The inclusion of the ex vivo model increases the likelihood that the obtained observations will have translational significance and will become a starting point for further preclinical studies and the development of modern methods of articular cartilage regeneration.

6. PLANNED FORM OF THE DOCTORAL DISSERTATION:



MANUSCRIPT – traditional form of an unpublished dissertation



SERIES OF PUBLICATIONS – a thematically coherent set of published articles



HYBRID MODE – a thematically coherent set of published articles and unpublished manuscripts