



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój

**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny



*„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”*

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda  
Polskiej Akademii Nauk



**Sandra Daria Stannitz**

**Charakterystyka biologiczna mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) pozyskanych ze szpiku kostnego owiec oraz ocena efektywności zastosowania bioimplantu wzbogaconego w MSC w rekonstrukcji dużych ubytków tkanki kostnej w eksperymentalnym modelu owcy**

Autoreferat

**Promotorzy:**

prof. dr hab. Aleksandra Klimczak  
prof. dr hab. Zdzisław Kiełbowicz

Samodzielne Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych

Wrocław 2022



Politechnika Wroclawska



Uniwersytet  
Wrocławski



UNIWERSYTET  
PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU

## **SPIS TREŚCI**

<b>WPROWADZENIE .....</b>	<b>3</b>
<b>CEL PRACY .....</b>	<b>6</b>
<b>OMÓWIENIE WYNIKÓW .....</b>	<b>7</b>
<b>WNIOSKI.....</b>	<b>15</b>
<b>DOROBEK NAUKOWY .....</b>	<b>16</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>19</b>

## WPROWADZENIE

Tkanka kostna, jako szczególnie dynamiczna tkanka łączna, ma ogromne zdolności regeneracyjne. Ulega ciągłej przebudowie, polegającej na usuwaniu uszkodzonych komórek kostnych przez osteoklasty, a następnie tworzeniu nowej tkanki kostnej przez osteoblasty [1]. Pomimo wyjątkowych właściwości regeneracyjnych tkanki kostnej, każdego roku na całym świecie odnotowuje się ponad 150 milionów nowych złamań [2], z których około 10-20% ma skłonność do nieprawidłowego zrastania się lub całkowitego jego braku [3]. Najtrudniejszymi przypadkami klinicznymi w ortopedii są duże uszkodzenia kości, powstałe na skutek rozległego urazu lub spowodowane resekcją guza [4]. Jeśli zbyt duży obszar kości jest utracony, nie będzie ona zrastać się samoistnie, a stan ten nazywany jest ubytkiem kostnym o rozmiarze krytycznym, zdefiniowanym jako większy niż 1-2 cm długości i 50% obwodu kości [5]. Choroby kości stanowią ogromne obciążenie zdrowotne, ekonomiczne i społeczne szczególnie w populacji w zaawansowanym wieku [6]. Choć chirurgia ortopedyczna poczyniła ogromne postępy, to nadal złotym standardem w naprawie ubytków kostnych są dominujące przeszczepienia kostne autologiczne lub allogeniczne. Jednak zapotrzebowanie kliniczne na przeszczepienia kostne znacznie przekracza dostępne możliwości tradycyjnych, naturalnych auto- lub alloprzeszczepów kostnych, zwłaszcza biorąc pod uwagę zbliżający się globalny problem otyłości i wspomniane wcześniej starzenie się społeczeństwa [7]. Ponadto, operacja jest niezwykle uciążliwa i bolesna dla pacjentów, a powrót do zdrowia może trwać miesiącami lub latami [8]. Co więcej, istnieją ograniczenia związane z alloprzeszczepami kostnymi, takie jak powikłania w miejscu pobrania, gorsze gojenie w porównaniu z przeszczepami autologicznymi oraz ryzyko przeniesienia chorób i czynników infekcyjnych [7]. W związku z tym, potrzebne są bardziej efektywne alternatywne metody leczenia dużych ubytków kostnych.

Postęp technologiczny w dziedzinie medycyny regeneracyjnej ubytków kostnych wprowadził innowacyjne rusztowania wykonane z biomateriałów, które mogą stanowić implant ortopedyczny. Biomateriały, z których zbudowane są rusztowania, są w stanie wywołać kontrolowane działanie i reakcję w środowisku biologicznym uszkodzenia kostnego. Jednakże same biomateriały służą raczej jako przewodnik dla tkanki kostnej, a nie jako czynnik osteoindukcyjny, który rekrutowałby różnego rodzaju komórki wspomagające regenerację kości lub stymulowałby niedojrzałe komórki do różnicowania w kierunku osteogennym. W celu zapewnienia zarówno strukturalnej, jak i funkcjonalnej integralności w złożonych uszkodzeniach kostnych, konieczne jest zastosowanie konstruktów inżynierii tkankowej, złożonych z komórek o właściwościach osteoindukcyjnych i rusztowań [9]. Dodatkowo, by zwiększyć potencjał różnicowania osteogennego na różnych jego etapach, można wykorzystać czynniki biologicznie aktywne [10]. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC, ang. *mesenchymal stem cells*) są obiecującym narzędziem w regeneracji ubytków kostnych

ze względu na ich: (1) zdolność do samoodnowy i różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej, (2) dostępność w dużych ilościach, (3) możliwość zastosowania zarówno w przeszczepieniach autologicznych, jak i allogenicznych, (4) bezbolesne metody izolacji oraz (5) zgodność z wytycznymi wdrażania Dobrych Praktyk Wytwarzania (GMP, ang. *Good Manufacturing Practice*), (6) zdolność do wydzielania czynników bioaktywnych, które wpływają na inne komórki, regulując ich funkcje biologiczne, takie jak migracja, proliferacja, komunikacja i różnicowanie [11].

Na właściwości biologiczne MSC mogą wpływać specyficzne warunki hodowli, takie jak skład medium, czy właściwości biomateriału w hodowli 3D [12]. W celu zwiększenia potencjału osteogennego MSC można zastosować czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2, ang. *fibroblast growth factor-2*) oraz osteogenne czynniki różnicujące, białko morfogenetyczne kości 2 (BMP-2, ang. *bone morphogenetic protein-2*). Cytokiny BMP i FGF należą do głównych regulatorów kaskady regeneracji kości [13]. FGF-2 reguluje migrację, proliferację i różnicowanie wielu typów komórek, w tym komórek śródbłonna naczyniowego i osteoblastów. BMP są obecnie uważane za białka o najkorzystniejszym wpływie na naprawę dużych ubytków kostnych. Biorą one udział w rozwoju szkieletu oraz w osteogennym różnicowaniu MSC i tworzeniu kości. Ponadto, Agencja Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) zatwierdziła BMP-2 do zastosowania klinicznego w leczeniu złamań kości [10, 11, 14]. Wykazano, że FGF-2 i BMP-2 mają korzystny, synergistyczny wpływ na osteogenne różnicowanie MSC. [11, 14-17]. Jednak, efekt ten nie jest w pełni wyjaśniony i wymaga dalszych badań przed bezpiecznym zastosowaniem klinicznym.

W inżynierii tkankowej rusztowania zapewniają komórkom MSC warunki do hodowli 3D i interakcje z innymi komórkami, pełniąc rolę macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto, zwiększają ich właściwości regeneracyjne, prowadząc do tworzenia tkanki kostnej [18]. Kliniczne zastosowanie biomateriałów w ortopedii musi być bezpieczne i skuteczne, dlatego wymaga rusztowań o odpowiedniej charakterystyce, takiej jak biokompatybilność, stymulacja osteogenna, właściwości mechaniczne oraz brak reakcji immunologicznej podczas implantacji do kości gospodarza [19]. Biodegradowalne rusztowania składające się z kompozytów, takich jak polimery połączone z ceramiką, wykazują lepsze właściwości fizykochemiczne niż rusztowania niekompozytowe. Przykładowo, zatwierdzony przez FDA polikaprolakton (PCL, ang. *polycaprolactone*) połączony z ceramiką, np. fosforanem trójwapniowym (TCP, ang. *tricalcium phosphate*) i hydroksyapatytem (HAP, ang. *hydroxyapatite*), wykazuje zarówno kontrolowany potencjał kinetyczny degradacji polimerów, jak i znaczący potencjał bioaktywny ceramiki [20].

Mimo tego, że przeprowadzono wiele badań *in vitro* i *in vivo* z wykorzystaniem konstruktów inżynierii tkankowej w regeneracji dużych ubytków kostnych, konieczne są dalsze badania

w celu przeprowadzenia udanych prób klinicznych u ludzi. W szczególności kluczowe jest zoptymalizowanie metod hodowli MSC na odpowiednim rusztowaniu i stymulacji czynnikami bioaktywnymi, w celu uzyskania konstruktów inżynierii tkankowej o właściwościach pożądanых w regeneracji kości. Wybór odpowiedniego modelu zwierzęcego do badań *in vivo* jest bardzo ważny dla uzyskania dowodu koncepcji nowych technik inżynierii tkankowej kości. Gryzonie są najczęściej stosowanymi modelami zwierzęcymi w medycynie regeneracyjnej, jednak przedkliniczne modele dużych zwierząt zapewniają lepsze zrozumienie mechanizmu chorób człowieka. Jest to szczególnie istotne podczas badania chorób układu mięśniowo-szkieletowego, cienkie chrząstki i kości gryzoni stanowią nieadekwatną objętość i wielkość ubytków, a brak możliwości zarządzania długoterminowymi badaniami czyni je mniej przydatnymi do badań przedklinicznych niż duże modele zwierzęce [21]. Duże modele zwierzęce są bardziej korzystne ze względu na masę ciała, wielkość kości, podobieństwo strukturalne do człowieka oraz możliwość odpowiedniej symulacji biomechaniki ludzkich dużych ubytków kostnych. Ponadto odpowiedź immunologiczna w modelach dużych zwierząt jest bliższa ludzkiej, niż w modelach małych zwierząt. W związku z tym, aby naśladować warunki kliniczne właściwe dla człowieka, stosowanie modeli dużych zwierząt jest absolutnie konieczne [11].

## CEL PRACY

Celami rozprawy doktorskiej były: 1) charakterystyka biologiczna mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego owiec (BM-MSC, ang. *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*); 2) zwiększenie potencjału osteogennego komórek BM-MSC *in vitro*, poprzez stymulację cytokinami FGF-2 i BMP-2; 3) charakterystyka właściwości osteogennych konstruktów inżynierii tkankowej złożonego z rusztowania kompozytowego PCL/HAP/ $\beta$ -TCP, pokrytego nanohydroksyapatytem (n-HAP, ang. *nanohydroxyapatite*) oraz owczych BM-MSC stymulowanych FGF-2 i BMP-2 *in vitro*; 4) ocena biokompatybilności i potencjału osteogennego konstruktów rusztowanie-BM-MSC po heterotopowej implantacji do tkanek w okolicy żuchwy owcy.

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono badania interdyscyplinarne z zakresu biologii, weterynarii, chemii materiałowej oraz medycyny regeneracyjnej. Realizacja celu tych badań została podzielona na cztery części, opisane w dwóch oryginalnych publikacjach naukowych:

Gromolak S, Krawczenko A, Antończyk A, Buczak K, Kielbowicz Z, Klimczak A. **Biological Characteristics and Osteogenic Differentiation of Ovine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulated with FGF-2 and BMP-2.** *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(24):9726, IF = 5.924,

w której zawarto:

- 1) charakterystykę biologiczną MSC pochodzących ze szpiku kostnego owiec,
- 2) ocenę efektu stymulacji osteogennej owczych BM-MSC *in vitro* z użyciem cytokin FGF-2 i BMP-2;

Stamnitz S, Krawczenko A, Szałaj U, Górecka Ż, Antończyk A, Kielbowicz Z, Świąszkowski W, Łojkowski W, Klimczak A. **Osteogenic Potential of Sheep Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with BMP-2 and FGF-2 and Seeded on an nHAP-Coated PCL/HAP/ $\beta$ -TCP Scaffold.** *Cells*. 2022, 11(21):3446, IF = 7.666,

w której opisano:

- 3) charakterystykę właściwości osteogennych konstruktów rusztowanie-BM-MSC stymulowanych FGF-2 i BMP-2 *in vitro*,
- 4) ocenę biokompatybilności i potencjału regeneracyjnego konstruktów rusztowanie-BM-MSC po heterotopowej implantacji do tkanek w okolicy żuchwy owcy.

Wyżej wymienione publikacje stanowią rozprawę doktorską wraz z publikacją przeglądową, podsumowującą aktualny stan wiedzy na temat zastosowania MSC, rusztowań oraz czynników biologicznie czynnych w regeneracji ubytków kostnych:

Stamnitz S, Klimczak A. **Mesenchymal Stem Cells, Bioactive Factors, and Scaffolds in Bone Repair: From Research Perspectives to Clinical Practice.** *Cells*. 2021, 10(8):1925, IF = 7.666.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

### 1) Charakterystyka biologiczna MSC pochodzących ze szpiku kostnego owiec (Gromolak i wsp., *IJMS*, 2020, 21(24):9726).

Najczęściej wybieranym modelem zwierzęcym do oceny potencjału regeneracyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych są gryzonie, których komórki zostały dobrze scharakteryzowane. Jednym z nadrzędnych celów rozprawy doktorskiej była ocena efektywności zastosowania rusztowania wzbogaconego w autologiczne MSC w rekonstrukcji dużych ubytków tkanki kostnej, zatem w pracy doktorskiej wykorzystano MSC pochodzące ze szpiku kostnego owiec. W związku z tym, że symulacja odpowiedniej biomechaniki dużych ubytków kostnych człowieka jest niemożliwa z wykorzystaniem małych modeli zwierzęcych, takich jak myszy, czy szczury, do badań wykorzystano owcę, jako duży model zwierzęcy. MSC ze szpiku kostnego owiec nie były dotychczas szczegółowo scharakteryzowane (w dostępnej literaturze brak kompleksowej analizy z użyciem przeciwciał specyficznych dla komórek MSC owcy), dlatego w pierwszej kolejności wykonano podstawowe badania biologiczne na komórkach, aby można było je zakwalifikować do kategorii MSC. Zgodnie z definicją Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowych (ISCT, ang. *International Society for Cellular Therapy*), MSC są komórkami o ściśle określonym fenotypie oraz posiadającymi zdolność do różnicowania się w komórki tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej. MSC do zastosowań klinicznych muszą charakteryzować się odpowiednią jakością, dlatego pierwszym krokiem w badaniach doktorskich była ocena markerów powierzchniowych CD (ang. *cluster of differentiation*), tempa proliferacji oraz właściwości multipotencjalnych. Rozprawa doktorska miała na celu zwiększenie potencjału osteogennego MSC, dlatego w publikacji scharakteryzowano owcze MSC, które po raz pierwszy były traktowane FGF-2 lub FGF-2 w kombinacji z BMP-2, pełniącymi funkcje stymulatorów osteogenezy.

Analiza fenotypu owczych BM-MSC (1) nietraktowanych (jako kontrola), (2) stymulowanych FGF-2 oraz (3) FGF-2 i BMP-2, została przeprowadzona w 7, 14 i 21 dniu hodowli, w czasie różnicowania osteogennego. Wykazano, że BM-MSC charakteryzowały się wysokim poziomem ekspresji CD73, CD90 i CD105 oraz bardzo niskim lub brakiem ekspresji CD34, CD45 i HLA DR, niezależnie od tego, czy były traktowane cytokinami, czy nie. Wyniki badań potwierdziły, że owcze BM-MSC zachowały fenotyp natywnych MSC zgodnie z kryteriami ISCT. Ponadto, procentowy odsetek komórek CD73 i CD105 pozytywnych wzrastał w czasie hodowli, co potwierdziło czystość hodowli owczych BM-MSC. Poziom ekspresji CD90 zbadano metodą PCR, ponieważ nie było dostępnego przeciwciała anty-CD90 specyficznego wobec komórek owcy. Co ciekawe, najwyższy poziom ekspresji CD90 zaobserwowano dla komórek kontrolnych, natomiast najniższy dla BM-MSC traktowanych FGF-2 i BMP-2. Sugeruje to, że poziom ekspresji markera CD90 w owczych BM-MSC spada

w czasie różnicowania osteogennego, stymulowanego przez FGF-2 i BMP-2. Drugie badanie, mające na celu potwierdzenie klasyfikacji wyizolowanych ze szpiku kostnego owcy komórek, polegało na wykonaniu różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej. Testy wykonano z użyciem komercyjnie dostępnych mediów różnicujących. W celu zbadania wpływu FGF-2 i BMP-2 na zdolności różnicujące owczych BM-MSC, do mediów dodano FGF-2 lub FGF-2 w kombinacji z BMP-2. Na podstawie barwienia komórek czerwienią alizarinową, nie można było zaobserwować znaczących różnic pomiędzy komórkami nietraktowanymi, a suplementowanymi FGF-2 lub FGF-2 i BMP-2, gdyż intensywność zabarwienia w każdym przypadku była bardzo wysoka. Natomiast zaobserwowano różnice w zdolności owczych BM-MSC do różnicowania chondrogennego. Komórki traktowane obiema cytokinami FGF-2 i BMP-2 charakteryzowały się zwiększoną intensywnością barwienia błękitem alcjanowym, w porównaniu z komórkami nietraktowanymi. Owce BM-MSC posiadały również zdolność różnicowania adipogennego, więc spełniały wszystkie kryteria ISCT, dzięki którym można było je zakwalifikować do MSC. Dodatkowo, w tej części badań, sprawdzono wpływ FGF-2 lub FGF-2 w kombinacji z BMP-2 na potencjał proliferacyjny owczych BM-MSC. Największe tempo proliferacji zaobserwowano dla BM-MSC traktowanych FGF-2, ponieważ jest to cytokina stymulująca proliferację wielu komórek, m.in. MSC, czy fibroblastów. Traktowanie komórek obiema cytokinami FGF-2 i BMP-2 spowodowało spadek tempa proliferacji, choć nadal był on większy niż w przypadku komórek nietraktowanych. Sugeruje to, że komórki traktowane FGF-2 i BMP-2 mają większy potencjał różnicowania osteogennego, w którym obserwuje się spadek tempa proliferacji na rzecz procesu różnicowania.

Wyniki pierwszej części badań doktorskich, w której po raz pierwszy dokonano klasyfikacji komórek, traktowanych FGF-2 lub FGF-2 w kombinacji z BMP-2, wyizolowanych ze szpiku kostnego owiec według kryteriów ISCT, pokazują, że owce BM-MSC stymulowane w kierunku osteogennym FGF-2 i BMP-2 nie tracą charakterystycznego dla MSC fenotypu w hodowli długoterminowej i posiadają zdolność do różnicowania osteogennego, chondrogennego i adipogennego. Traktowanie owczych BM-MSC cytokinami FGF-2 i BMP-2 zwiększa tempo proliferacji komórek, w porównaniu z kontrolą. Jednak największy wpływ na tempo proliferacji ma FGF-2. Wyniki badań sugerują synergistyczny wpływ cytokin na owce BM-MSC, w którym FGF-2 pełni główną rolę w procesie proliferacji, a BMP-2 jest stymulatorem różnicowania osteogennego.

## **2) Ocena efektu stymulacji osteogennej MSC ze szpiku kostnego owiec cytokinami FGF-2 i BMP-2 (Gromolak i wsp., *IJMS*, 2020, 21(24):9726).**

Po dokonaniu klasyfikacji komórek wyizolowanych ze szpiku kostnego owiec do kategorii MSC, traktowanych lub nie FGF-2 lub FGF-2 i BMP-2, w dalszej części badań sprawdzono wpływ FGF-2 i BMP-2 na potencjał osteogeny BM-MSC. W tym celu oceniono morfologię



komórek w medium suplementowanym cytokinami przez 21 dni, intensywność fluorescencji markerów osteogennych: osteokalcyny i kolagenu I, zmiany w relatywnym poziomie ekspresji genów wczesnych markerów różnicowania osteogennego: *BMP-2*, *Runx2*, *osterix (Osx)*, *kolagenu I (Coll)* oraz późnych etapów osteogenezy: *osteokalcyny (Ocl)* i *osteopontyny (Opn)*, a także profil cytokinowy w czasie 21 dni hodowli w zależności od zastosowanego medium hodowlanego.

Już w pierwszym badaniu, porównującym morfologię owczych BM-MSC w zależności od medium hodowlanego, zaobserwowano znaczące różnice w przypadku komórek traktowanych FGF-2 i BMP-2, w porównaniu z komórkami hodowanymi w medium kontrolnym  $\alpha$ MEM (ang. *Minimum Essential Medium  $\alpha$ -transformation*) lub z dodatkiem FGF-2. Owcze BM-MSC po 21 dniach inkubacji w medium (1)  $\alpha$ MEM lub (2)  $\alpha$ MEM z FGF-2 wykazywały typowy kształt fibroblastyczny. Natomiast po stymulacji obiema cytokinami (3) FGF-2 i BMP-2, komórki nadal zachowywały typowy kształt fibroblastyczny, jednak interesującą obserwacją było, że w hodowli z obiema cytokinami tworzyły dodatkowo struktury osteoblastopodobne. Obserwacja ta potwierdziła proosteogenną rolę BMP-2. W przypadku hodowli BM-MSC w komercyjnym medium do różnicowania osteogennego, odnotowano różnice w gęstości zmineralizowanej macierzy komórkowej, w zależności od dodanych cytokin. Była ona większa w przypadku traktowania komórek FGF-2 lub FGF-2 w kombinacji z BMP-2. W kolejnym badaniu wykazano, że intensywność fluorescencji kolagenu I i osteokalcyny w przypadku BM-MSC traktowanych obiema cytokinami FGF-2 i BMP-2 była wyższa, w porównaniu z komórkami kontrolnymi lub stymulowanymi samym FGF-2. Oprócz wpływu FGF-2 i BMP-2 na obecność dwóch białek, związanych z osteogenezą w owczych BM-MSC, dokonano również szczegółowej analizy ich wpływu na relatywny poziom ekspresji wczesnych i późnych markerów osteogennych po 7, 14 i 21 dniach hodowli. Wyniki pokazały, że najwyższy poziom ekspresji markera wczesnych etapów różnicowania osteogennego *BMP-2* występował w 14 dniu hodowli BM-MSC traktowanych FGF-2 i BMP-2. Dodatek samego FGF-2 do hodowli również zwiększał poziom ekspresji *BMP-2*, w porównaniu z kontrolą, ale mimo to był on niższy niż w przypadku stymulacji obiema cytokinami. Różnice te były wyraźnie widoczne zwłaszcza w 14 i 21 dniu hodowli. Relatywny poziom ekspresji kolejnych markerów wczesnych etapów różnicowania osteogennego *Runx2* i *osterix* wzrósł po 14 dniach hodowli i był najwyższy w BM-MSC traktowanych FGF-2 i BMP-2. BM-MSC hodowane w  $\alpha$ MEM z FGF-2 przez 21 dni charakteryzowały się najwyższym poziomem ekspresji *kolagenu I*. Natomiast relatywny poziom ekspresji późnych markerów osteogenezy: *osteokalcyny* i *osteopontyny* był najwyższy po 21 dniach hodowli BM-MSC z FGF-2 w kombinacji z BMP-2. Ostatnie wyniki tej części badań pracy doktorskiej dotyczyły różnic w profilu wydzielniczym owczych BM-MSC w zależności od stymulacji cytokinami FGF-2 lub FGF-2 z BMP-2, na podstawie analizy

18 cytokin w supernatantach pochodzących. Ciekawą obserwacją we wszystkich badanych supernatantach był bardzo wysoki poziom dekoryny, białka macierzy kostnej biorącego udział w etapie przebudowy kości. Wykazano, że FGF-2 zwiększa poziom cytokin proangiogennych i immunomodulacyjnych: VEGF-A (ang. *vascular endothelial growth factor A*), MIG (ang. *monokine induced by gamma interferon*), sFRP-3 (ang. *secreted frizzled-related protein 3*) i TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) w supernatantach pochodzących odczynnych BM-MSCs. Natomiast traktowanie komórek obiema cytokinami FGF-2 i BMP-2 skutkowało spadkiem poziomu cytokiny prozapalnej IL-8 (ang. *interleukin-8*).

Podsumowując, w drugiej części badań pracy doktorskiej wykazano, że traktowanie odczynnych BM-MSCs cytokinami FGF-2 i BMP-2 zwiększało ich potencjał osteogeny, począwszy od wczesnych etapów tworzenia kości do późnej fazy mineralizacji. Ponadto, FGF-2 i BMP-2 wpływały na profil wydzielniczy BM-MSCs, regulując poziom cytokin związanych z różnicowaniem osteogenym, proangiogenym i immunomodulacyjnym.

### **3) Charakterystyka właściwości osteogennych konstruktów rusztowania-BM-MSCs stymulowanych FGF-2 i BMP-2 *in vitro* (Stamnitz i wsp., *Cells*, 2022, 11(21):3446).**

W badaniach nad innowacyjnymi metodami leczenia ubytków kostnych z zastosowaniem MSC, bardzo istotnym etapem jest zwiększenie ich potencjału osteogenego. W pierwszej publikacji wykazano, że FGF-2 i BMP-2 mają synergistyczny wpływ na różnicowanie osteogenne odczynnych BM-MSCs. FGF-2 zwiększa potencjał osteogeny MSC poprzez stymulację proliferacji komórek we wczesnych etapach osteogenezy oraz regulację potencjału osteoindukcyjnego BMP-2, natomiast sam BMP-2 pełni rolę induktora osteogenezy. Niemniej jednak, regeneracja ubytków kostnych z wykorzystaniem samych terapii komórkowych często kończy się niepowodzeniem, ponieważ brakuje matrycy, na której komórki mogą tworzyć struktury 3D, tak jak w przypadku ich naturalnego środowiska w tkance. Problem ten może być rozwiązany poprzez stworzenie konstruktów inżynierii tkankowej, składającego się z biodegradowalnego rusztowania oraz MSC o zwiększonym potencjale osteogenym. W drugiej publikacji po raz pierwszy przeprowadzono interdyscyplinarne badania nad właściwościami osteogenymi konstruktów złożonego z rusztowania PCL/HAP/ $\beta$ -TCP pokrytego n-HAP oraz odczynnych BM-MSCs indukowanych lub nie w kierunku osteogenezy cytokinami FGF-2 i BMP-2. W pierwszej kolejności zbadano zdolność BM-MSCs do adhezji i proliferacji na rusztowaniu, a następnie przeprowadzono właściwą charakterystykę osteogeną zróżnicowanych odczynnych BM-MSCs na rusztowaniu, analizując intensywność barwienia czerwienią alizarinową, aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP, ang. *alkaline phosphatase*) oraz poziom ekspresji markerów osteogenezy. W celu sprawdzenia wpływu FGF-2 i BMP-2 na potencjał osteogeny BM-MSCs hodowanych na rusztowaniu, podobnie jak w pierwszej

publikacji, badania wykonano w trzech mediach hodowlanych: (1)  $\alpha$ MEM, (2)  $\alpha$ MEM + FGF-2, (3)  $\alpha$ MEM + FGF-2 + BMP-2.

Obserwacje mikroskopowe wykazały, że owcze BM-MSC miały zdolności adhezyjne do struktur rusztowania i utrzymywały aktywność proliferacyjną przez 21 dni inkubacji. Traktowanie BM-MSC obiema cytokinami FGF-2 i BMP-2 miało najkorzystniejszy wpływ na ich potencjał adhezyjny i proliferacyjny na rusztowaniu. W celu dokładniejszej oceny rozmieszczenia BM-MSC na rusztowaniu, oprócz obserwacji pod mikroskopem świetlnym, jądra komórkowe wybarwiono DAPI i obserwowano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego. Tutaj również potwierdzono, że stymulowanie BM-MSC obiema cytokinami FGF-2 i BMP-2 zwiększało zdolności komórek do przylegania i proliferacji na rusztowaniu, w porównaniu z komórkami nietraktowanymi. W celu oceny efektywności osadzania BM-MSC na rusztowaniu w zależności od medium hodowlanego, wyznaczono liczbę komórek po 3h inkubacji na rusztowaniu. Największą liczbę BM-MSC na rusztowaniu zaobserwowano w przypadku hodowli komórek w  $\alpha$ MEM z FGF-2 i BMP-2. Natomiast najszybsze tempo proliferacji odnotowano dla BM-MSC hodowanych na rusztowaniu w  $\alpha$ MEM z FGF-2, co wiąże się z właściwościami proliferacyjnymi FGF-2, o czym wspomniano wcześniej. Dalsze wyniki tej części badań dotyczyły wpływu FGF-2 i BMP-2 na potencjał osteogeny BM-MSC hodowanych na rusztowaniu. Wykazano, że dodanie do medium różnicującego jedynie FGF-2 nie wpłynęło istotnie na mineralizację macierzy BM-MSC hodowanych na rusztowaniu PCL/HAP/ $\beta$ -TCP pokrytym nHAP. Jednakże komórki traktowane zarówno FGF-2, jak i BMP-2, wykazywały większą intensywność barwienia czerwienią alizarinową. Podobnie jak w przypadku oceny intensywności barwienia czerwienią alizarinową, najsilniejszy wpływ na aktywność ALP odnotowano dla BM-MSC poddanych działaniu FGF-2 i BMP-2, co sugeruje znaczącą rolę BMP-2 w kontroli procesu osteogenego. W celu potwierdzenia synergistycznego wpływu FGF-2 i BMP-2 na osteogeny potencjał różnicowania owczych BM-MSC hodowanych na rusztowaniu, zbadano również ekspresję mRNA markerów związanych z osteogenezą (wykorzystanych w pierwszej publikacji). We wczesnych punktach czasowych, 7 i 14 dni, nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie ekspresji *Runx2* pomiędzy grupami. Jednak po 21 dniach inkubacji, BM-MSC hodowane na rusztowaniu i traktowane FGF-2 i BMP-2, wykazywały znacząco wyższą ekspresję *Runx2* niż komórki nietraktowane lub komórki traktowane tylko FGF-2. Ekspresja kolejnego wczesnego markera osteogenezy, *osterix*, wzrosła istotnie po 7 i 14 dniach inkubacji w BM-MSC poddanych działaniu FGF-2 i BMP-2, w porównaniu z komórkami nietraktowanymi lub poddanymi tylko działaniu FGF-2. Najwyższy poziom ekspresji odnotowano jednak w 21 dniu. Dane te sugerują, że ekspresja *osterix* jest zależna od BMP-2 zarówno na wczesnym, jak i na późnym etapie osteogenezy. Poziom ekspresji *BMP-2* wzrastał w czasie we wszystkich warunkach hodowli. W 14 dniu

inkubacji najwyższy poziom jego względnej ekspresji odnotowano w BM-MSC traktowanych zarówno FGF-2, jak i BMP-2. Jednak po 21 dniach najwyższy poziom ekspresji *BMP-2* zaobserwowano w komórkach traktowanych FGF-2. Poziom ekspresji *kolagenu typu I* zmniejszył się po 14 dniach inkubacji BM-MSC niezależnie od stymulacji cytokinami i nieznacznie wzrósł po 21 dniach, jednak był nadal niższy niż w 7 dniu. Zgodnie z założeniami, poziom ekspresji późnego markera osteogenezy, *osteokalcyny*, wzrósł znacząco po 21 dniach hodowli, jednak najwyższy jej poziom odnotowano dla BM-MSC poddanych działaniu FGF-2. Poziom ekspresji drugiego późnego markera osteogenego, *osteopontyny*, wzrastał nieznacznie w czasie i był najwyższy w komórkach traktowanych FGF-2 i BMP-2 po 21 dniach inkubacji.

Wyniki te pokazały, że FGF-2 i BMP-2 zwiększają potencjał adhezyjny i proliferacyjny owczych BM-MSC hodowanych na rusztowaniu PCL/HAP/ $\beta$ -TCP pokrytym nHAP. Ponadto, BM-MSC hodowane w medium osteogennym z dodatkiem FGF-2 i BMP-2 miały najwyższy potencjał różnicowania osteogenego, oceniony na podstawie barwienia czerwienią alizarinową i aktywności ALP. Dodatkowo, analiza qRT-PCR wykazała zwiększoną ekspresję genów markerów osteogennych w BM-MSC, jeżeli były hodowane w medium  $\alpha$ MEM z FGF-2 i BMP-2.

#### **4) Ocena biokompatybilności i potencjału regeneracyjnego konstruktów po heterotopowej implantacji do tkanek w okolicy żuchwy owcy (Stamnitz i wsp., *Cells*, 2022, 11(21):3446).**

Sukces badań klinicznych u ludzi w dużej mierze zależy od powodzenia przeprowadzonych wcześniej badań *in vivo* na zwierzętach. W dziedzinie regeneracji dużych ubytków kostnych wybór odpowiedniego modelu zwierzęcego jest kluczowy. Duże zwierzęta, takie jak owce, są bardzo dobrym modelem eksperymentalnym, ponieważ mają wiele podobieństw do człowieka, m.in. wielkość kości, siła jej obciążenia, czy podobna odpowiedź układu immunologicznego. W związku z tym, ostatnim etapem rozprawy doktorskiej była analiza biokompatybilności oraz pilotażowe badania nad potencjałem regeneracyjnym konstruktów rusztowanie-autologiczne BM-MSC po implantacji konstruktów do tkanek okolicy żuchwy u czterech owiec. Zabiegi chirurgiczne zostały wykonane przez doświadczonych chirurgów w Katedrze i Klinice Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

W celu oceny biokompatybilności implantowanego rusztowania pokrytego BM-MSC, zbadano aktywność cytokin prozapalnych związanych z odpowiedzią immunologiczną oraz czynników troficznymi zaangażowanych w osteogenezę. Próbkami surowicy owiec poddanych wszczepieniu rusztowania z BM-MSC traktowanymi FGF-2 (n = 2) lub FGF-2 i BMP-2 (n = 2) pobrano tydzień przed (jako poziom wyjściowy), a także jeden, dwa i cztery tygodnie po zabiegu. Wykazano, że w próbkach surowic od owiec 1 i 2, które zostały poddane wszczepieniu rusztowania i BM-MSC traktowanych FGF-2, poziom cytokin prozapalnych, w tym IL-8, IFN-gamma (ang. *interferon gamma*), IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-17A, IL-21, MIG i TNF-alfa, jest taki

sam lub nieznacznie obniżony w porównaniu z poziomem tych cytokin przed operacją. Jedynie w surowicy jednej owcy wykazano podwyższony poziom cytokin prozapalnych cztery tygodnie po wszczepieniu konstruktów rusztowanie-BM-MSC (prekondycjonowane FGF-2 i BMP-2) w porównaniu z wartością wyjściową (tydzień przed zabiegiem). Nie zaobserwowano jednak klinicznych objawów zapalenia u tej owcy. Poziomy sFRP-3 i dekoryny były bardzo wysokie we wszystkich analizowanych próbkach, niezależnie od punktu czasowego pobrania. sFRP-3 promuje osteogenne różnicowanie MSC, natomiast dekoryna bierze udział w procesie tworzenia kości. Pilotażowe badania, mające na celu ocenę potencjału osteogennego konstruktów rusztowanie-BM-MSC *in vivo*, opierały się na barwieniu immunofluorescencyjnym wycinków tkankowych pobranych 6 miesięcy po implantacji, na obecność białek specyficznych dla osteoblastów: kolagenu typu I, jako wczesnego markera różnicowania osteogennego oraz osteokalcyny, jako późnego markera. Wykazano obecność obu białek w miejscu implantacji konstruktów rusztowanie-BM-MSC we wszystkich badanych wycinkach. Nie stwierdzono istotnych różnic w intensywności barwienia immunofluorescencyjnego kolagenu typu I i osteokalcyny pomiędzy skrawkami pobranymi od owiec, którym wszczepiono rusztowanie i BM-MSC poddane działaniu samego FGF-2 lub FGF-2 i BMP-2.

Pilotażowe badania *in vivo* pokazały, że w wykorzystanym modelu owcy BM-MSC wykazują aktywność parakrynną, modulując lokalne środowisko, łagodząc odpowiedź zapalną i przyspieszając procesy regeneracyjne. Konstrukt rusztowanie-BM-MSC wykazywał biokompatybilność oraz potencjał proosteogeny. Wstępne obserwacje *in vivo* stanowią podstawę do dalszych badań i pomogą w rekonstrukcji dużych ubytków kości w obszarze żuchwy w eksperymentalnym modelu owcy.

##### **5) Zastosowanie MSC, rusztowań oraz czynników biologicznie czynnych w regeneracji ubytków kostnych (Stamnitz, Klimczak, *Cells*. 2021, 10(8):1925).**

Powyższe wyniki, opublikowane w dwóch pracach oryginalnych, podsumowuje trzecia publikacja – przeglądowa, która opisuje aktualny stan wiedzy na temat konstruktów komórkowych w inżynierii tkanki kostnej. Celem tej pracy było przedstawienie najnowszych odkryć związanych z terapiami MSC wspomaganymi rusztowaniami w regeneracji kości. W pierwszej kolejności szczegółowo opisano rolę MSC w tworzeniu i regeneracji kości. Następnie przeanalizowano proces projektowania biomateriałów kostnych z wykorzystaniem MSC z perspektywy badawczej. Na koniec przedstawiono przykłady przedklinicznych badań na zwierzętach oraz sukcesy klinicznych badań z użyciem MSC i rusztowań w naprawie kości.

Przykładowo, zaobserwowano tworzenie się nowej kości w miejscu ubytku kostnego (o rozmiarze większym niż 1cm x 1cm) po terapii z wykorzystaniem gąbki kolagenowej, Col (Orthoss®, Fa Geistlich, Wolhusen, Switzerland) lub rusztowania hydroksyapatytowego, HA (Gelaspon®, Fa. Chauvin Ankerpharm GmbH, Berlin, Germany) oraz szpiku kostnego

u wszystkich 39 badanych pacjentów. Co ciekawe, całkowita regeneracja ubytku kostnego została odnotowana szybciej w przypadku zastosowania hydroksyapatytu (po ok. 17,3 tygodnia) niż w przypadku gąbki kolagenowej (22,4 tygodnia) (Study #3096 Ethics Committee of the Heinrich Heine University Duesseldorf) [22]. Innym przykładem owocnych badań klinicznych w tej dziedzinie było zastosowanie rusztowania  $\beta$ -TCP z autologicznymi BM-MSC u pacjentów cierpiących z powodu ubytków kości udowej. Efektem leczenia było remodelowanie kości w miejscu ubytku po 12 miesiącach u wszystkich 9 badanych pacjentów. Natomiast zastosowanie samego rusztowania  $\beta$ -TCP skutkowało remodelingiem kości jedynie u jednego z 9 badanych pacjentów grupy kontrolnej (EudraCT number 2012-005599-33, EU Clinical Trials Register) [23]. Wykorzystanie rusztowania kompozytowego, złożonego z  $\beta$ -TCP i HA oraz autologicznych BM-MSC u 28 pacjentów cierpiących z powodu braku zrостu kości długich, skutkowało odbudową kości u 26 pacjentów po 12 miesiącach od wszczepienia rusztowania komórkowego (EudraCT, 2011-005441-13 EU Clinical Trials Register) [24].

Podsumowując, mezenchymalne komórki macierzyste uczestniczą w regeneracji kości. Oprócz tego, że bezpośrednio różnicują się w osteogenne komórki progenitorowe, to także poprzez aktywność parakrynną, wydzielają cytokiny i czynniki wzrostu, biorące udział w osteogenezie. Jednak same MSC nie są w stanie pokryć dużych ubytków kostnych. Nowoczesne technologie, które wykorzystują biomateriały o odpowiedniej strukturze, mogą wspierać właściwości osteoindukcyjne zastosowanych MSC. Należy pamiętać, że kluczowym etapem rozwoju rusztowań komórkowych do zastosowań klinicznych jest opracowanie odpowiedniego przedklinicznego modelu zwierzęcego w celu oceny efektu najlepszego podejścia terapeutycznego. Pomyślne wyniki przedkliniczne umożliwiają ostatni etap rozwoju konstruktów inżynierii tkanki kostnej do zastosowania w badaniach klinicznych.

## WNIOSKI

- 1) Komórki wyizolowane ze szpiku kostnego owiec, suplementowane FGF-2 lub FGF-2 i BMP-2 w hodowli długoterminowej, zachowały fenotyp natywnych MSC i posiadały zdolność do różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej.
- 2) FGF-2 i BMP-2 zwiększały potencjał osteogeny owczych BM-MSC oraz modulowały ich profil wydzielniczy.
- 3) Owcze BM-MSC traktowane FGF-2 i BMP-2, umieszczone na rusztowaniu PCL/HAP/ $\beta$ -TCP pokrytym nHAP, miały zdecydowanie większy potencjał adhezyjny i osteogeny, w porównaniu z komórkami traktowanymi samym FGF-2 lub nietraktowanymi.
- 4) Konstrukcja złożona z rusztowania PCL/HAP/ $\beta$ -TCP pokrytego nHAP oraz autologicznych BM-MSC, traktowanych FGF-2 lub FGF-2 w kombinacji z BMP-2, był biokompatybilny z tkankami owcy oraz korzystnie wpływał na regenerację tkanki kostnej w żuchwie owiec, stanowiąc tym samym obiecującą strategię do zastosowania klinicznego w naprawie dużych ubytków kostnych.

### Publikacje

- 1) **Stamnitz S**, Krawczenko A, Szałaj U, Górecka Ż, Antończyk A, Kielbowicz Z, Świąszkowski W, Łojkowski W, Klimczak A. Osteogenic Potential of Sheep Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with BMP-2 and FGF-2 and Seeded on an nHAP-Coated PCL/HAP/ $\beta$ -TCP Scaffold. *Cells*. 2022, 11(21):3446.
- 2) Bar JK, Kowalczyk T, Grelewski PG, **Stamnitz S**, Paprocka M, Lis J, Lis-Nawara A, An S, Klimczak A. Characterization of Biological Properties of Dental Pulp Stem Cells Grown on an Electrospun Poly(L-lactide-co-caprolactone) Scaffold. *Materials*. 2022, 15(5):1900.
- 3) **Stamnitz S**, Klimczak A. Mesenchymal Stem Cells, Bioactive Factors, and Scaffolds in Bone Repair: From Research Perspectives to Clinical Practice. *Cells*. 2021, 10(8):1925.
- 4) **Gromolak S**, Krawczenko A, Antończyk A, Buczak K, Kielbowicz Z, Klimczak A. Biological Characteristics and Osteogenic Differentiation of Ovine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulated with FGF-2 and BMP-2. *Int J Mol Sci*. 2020, 21(24):9726.

### Projekty badawcze

- **Kierownik projektu**

“Zwiększenie potencjału regeneracyjnego tkanki chrzęstnej za pomocą stymulowanych FGF-2 i TGF- $\beta$ 3 mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) pochodzących ze szpiku kostnego owiec”

ExCELLent Grant finansowany przez Polski Bank Komórek Macierzystych S.A.

Czas realizacji: 15.09.2022 – 15.09.2023

- **Udział w projektach**

- 1) “Metoda leczenia dużych ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych z wykorzystaniem inżynierii tkankowej in vivo”,  
projekt STRATEGMED3/306888/3/NCBR/2017 finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.  
Czas realizacji: 1.10.2018 – 30.09.2022
- 2) „Badanie czynników o potencjale regeneracyjnym, produkowanych przez macierzyste komórki mezenchymalne izolowane z tkanki tłuszczowej”,  
projekt OPUS, nr 2012/07/B/NZ4/01820 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki.  
Czas realizacji: 3.10.2016 – 30.06.2018



## **Staż zagraniczne**

- 1) Mondor Biomedical Research Institute, Université Paris Est Créteil, France (4.02 – 28.02.2020), Engineering and Cellular Therapy Unit
- 2) Center for Molecular Biophysics, CNRS, Orleans, France (10.09 – 28.09.2018), Cellular microenvironment and pharmacological targets

## **Konferencje naukowe**

- 1) **Stamnitz S**, Krawczenko A, Antończyk A, Kiełbowicz Z, Klimczak A. Osteogenic potential of ovine bone marrow-derived mesenchymal stem cells stimulated with FGF-2 and BMP-2 and combined with 3D-scaffold. TERMIS EU, Kraków, Poland, 28.06-1.07.2022 (poster).
- 2) **Gromolak S**, Krawczenko A, Antończyk A, Buczak K, Kiełbowicz Z, Klimczak A. The stimulatory effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and fibroblast growth factor 2 (FGF-2) on osteogenic differentiation of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) in vitro. 16th XVII Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Białystok, Poland, 27-29.05.2021 (poster).
- 3) **Gromolak S**, Krawczenko A, Antończyk A, Bieżyński J, Liszka B, Kiełbowicz Z, Klimczak A. Bone morphogenetic protein-2 promotes the osteogenic differentiation of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. 16th Congress of the Cell Transplant and Regenerative Medicine Society, Lesvos, Greece, 21-25.09.2019 (prezentacja ustna).
- 4) **Gromolak S**, Krawczenko A, Paprocka M, Antończyk A, Kiełbowicz Z, Klimczak A. Osteogenic potential and deposition of ovine bone marrow-derived mesenchymal stem cells onto 3D-scaffold for bone repair. TERMIS EU, Tissue Engineering Therapies: From Concept to Clinical Translation & Commercialisation, Rhodes, Greece, 27-31.05.2019 (poster).
- 5) **Gromolak S**, Krawczenko A, Antończyk A, Bieżyński J, Liszka B, Kiełbowicz Z, Klimczak A. Biological characteristics of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their osteogenic differentiation potential for bone tissue engineering. 5th International Conference of Cell Biology, Kraków, Poland, 10-12.05.2019 (prezentacja ustna).
- 6) **Gromolak S**, Paprocka M, Kraśkiewicz H, Klimczak A. Human adipose-tissue-derived and bone-marrow-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium contain immunoregulatory cytokines and exhibit therapeutic potential in wound repair in vitro. 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, Netherlands, 2-5.09.2018 (poster).
- 7) **Gromolak S**, Paprocka M, Klimczak K. Porównanie fenotypu ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego i z tkanki tłuszczowej. III Poznańskie Dni Cytometrii i Immunopatologii, Poznań, Polska, 24-25.05.2018 (poster).

- 8) **Gromolak S**, Paprocka M. Bone marrow – vs adipose tissue-derived mesenchymal stem cell lines. 11th International Conference: Bone marrow transplantation – much more than haematopoietic tissue reconstitution, Wrocław, Poland, 18-20.12.2017 (poster).
- 9) Paprocka M, **Gromolak S**, Bielawska-Pohl A, Krawczenko A, Duś D. Comparison of human mesenchymal stem cell lines (MSC) derived from adipose tissue and bone marrow. III Scientific Congress of PTBMed and XII Scientific and Training Conference of the Immunotoxicology and Immunomodulation Section of the Polish Society of Experimental and Clinical immunology, Jastarnia, Poland, 20-24.09.2017 (prezentacja ustna).

## BIBLIOGRAFIA

1. Henkel, J.; Woodruff, M. A.; Epari, D. R.; Steck, R.; Glatt, V.; Dickinson, I. C.; Choong, P. F. M.; Schuetz, M. A.; Hutmacher, D. W., Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Research* **2013**, 1, (1), 216-248.
2. Wu, A.-M.; Bisignano, C.; James, S. L.; Abady, G. G.; Abedi, A.; Abu-Gharbieh, E.; Alhassan, R. K.; Alipour, V.; Arabloo, J.; Asaad, M.; Asmare, W. N.; Awedew, A. F.; Banach, M.; Banerjee, S. K.; Bijani, A.; Birhanu, T. T. M.; Bolla, S. R.; Cámara, L. A.; Chang, J.-C.; Cho, D. Y.; Chung, M. T.; Couto, R. A. S.; Dai, X.; Dandona, L.; Dandona, R.; Farzadfar, F.; Filip, I.; Fischer, F.; Fomenkov, A. A.; Gill, T. K.; Gupta, B.; Haagsma, J. A.; Haj-Mirzaian, A.; Hamidi, S.; Hay, S. I.; Ilic, I. M.; Ilic, M. D.; Ivers, R. Q.; Jürisson, M.; Kalhor, R.; Kanchan, T.; Kavetsky, T.; Khalilov, R.; Khan, E. A.; Khan, M.; Kneib, C. J.; Krishnamoorthy, V.; Kumar, G. A.; Kumar, N.; Laloo, R.; Lasrado, S.; Lim, S. S.; Liu, Z.; Manafi, A.; Manafi, N.; Menezes, R. G.; Meretoja, T. J.; Miazgowski, B.; Miller, T. R.; Mohammad, Y.; Mohammadian-Hafshejani, A.; Mokdad, A. H.; Murray, C. J. L.; Naderi, M.; Naimzada, M. D.; Nayak, V. C.; Nguyen, C. T.; Nikbakhsh, R.; Olagunju, A. T.; Otstavnov, N.; Otstavnov, S. S.; Padubidri, J. R.; Pereira, J.; Pham, H. Q.; Pinheiro, M.; Polinder, S.; Pourchamani, H.; Rabiee, N.; Radfar, A.; Rahman, M. H. U.; Rawaf, D. L.; Rawaf, S.; Saeb, M. R.; Samy, A. M.; Sanchez Riera, L.; Schwebel, D. C.; Shahabi, S.; Shaikh, M. A.; Soheili, A.; Tabarés-Seisdedos, R.; Tovani-Palone, M. R.; Tran, B. X.; Travillian, R. S.; Valdez, P. R.; Vasankari, T. J.; Velazquez, D. Z.; Venketasubramanian, N.; Vu, G. T.; Zhang, Z.-J.; Vos, T., Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Healthy Longevity* **2021**, 2, (9), e580-e592.
3. Marsell, R.; Einhorn, T. A., The biology of fracture healing. *Injury* **2011**, 42, (6), 551-5.
4. Iaquinta, M. R.; Mazzoni, E.; Bononi, I.; Rotondo, J. C.; Mazziotta, C.; Montesi, M.; Sprio, S.; Tampieri, A.; Tognon, M.; Martini, F., Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2019**, 7.
5. Schemitsch, E. H., Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J Orthop Trauma* **2017**, 31 Suppl 5, S20-s22.
6. Figliomeni, A.; Signorini, V.; Mazzantini, M., One year in review 2018: progress in osteoporosis treatment. *Clin Exp Rheumatol* **2018**, 36, (6), 948-958.
7. Wang, W.; Yeung, K. W. K., Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials* **2017**, 2, (4), 224-247.
8. Quinnan, S. M.; Lawrie, C., Optimizing Bone Defect Reconstruction—Balanced Cable Transport With Circular External Fixation. *Journal of Orthopaedic Trauma* **2017**, 31, (10).
9. Iaquinta, M. R.; Mazzoni, E.; Manfrini, M.; D’Agostino, A.; Trevisiol, L.; Nocini, R.; Trombelli, L.; Barbanti-Brodano, G.; Martini, F.; Tognon, M., Innovative biomaterials for bone regrowth. *International journal of molecular sciences* **2019**, 20, (3), 618.
10. Stammnitz, S.; Klimczak, A., Mesenchymal Stem Cells, Bioactive Factors, and Scaffolds in Bone Repair: From Research Perspectives to Clinical Practice. *Cells* **2021**, 10, (8), 1925.
11. Stammnitz, S.; Krawczyński, A.; Szałaj, U.; Górecka, Ż.; Antończyk, A.; Kielbowicz, Z.; Świążkowski, W.; Łojkowski, W.; Klimczak, A., Osteogenic Potential of Sheep Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with BMP-2 and FGF-2 and Seeded on an nHAP-Coated PCL/HAP/β-TCP Scaffold. *Cells* **2022**, 11, (21), 3446.
12. Perez, J. R.; Kouroupis, D.; Li, D. J.; Best, T. M.; Kaplan, L.; Correa, D., Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front Bioeng Biotechnol* **2018**, 6, 105.
13. Amarasekara, D. S.; Kim, S.; Rho, J., Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *Int J Mol Sci* **2021**, 22, (6).

14. Gromolak, S.; Krawczenko, A.; Antonczyk, A.; Buczak, K.; Kielbowicz, Z.; Klimczak, A., Biological Characteristics and Osteogenic Differentiation of Ovine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulated with FGF-2 and BMP-2. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, (24).
15. Kuhn, L. T.; Ou, G.; Charles, L.; Hurley, M. M.; Rodner, C. M.; Gronowicz, G., Fibroblast growth factor-2 and bone morphogenetic protein-2 have a synergistic stimulatory effect on bone formation in cell cultures from elderly mouse and human bone. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **2013**, *68*, (10), 1170-80.
16. Gronowicz, G.; Jacobs, E.; Peng, T.; Zhu, L.; Hurley, M.; Kuhn, L. T., (\*) Calvarial Bone Regeneration Is Enhanced by Sequential Delivery of FGF-2 and BMP-2 from Layer-by-Layer Coatings with a Biomimetic Calcium Phosphate Barrier Layer. *Tissue Eng Part A* **2017**, *23*, (23-24), 1490-1501.
17. Charles, L. F.; Woodman, J. L.; Ueno, D.; Gronowicz, G.; Hurley, M. M.; Kuhn, L. T., Effects of low dose FGF-2 and BMP-2 on healing of calvarial defects in old mice. *Exp Gerontol* **2015**, *64*, 62-9.
18. Chen, X.; Fan, H.; Deng, X.; Wu, L.; Yi, T.; Gu, L.; Zhou, C.; Fan, Y.; Zhang, X., Scaffold Structural Microenvironmental Cues to Guide Tissue Regeneration in Bone Tissue Applications. *Nanomaterials (Basel)* **2018**, *8*, (11).
19. Rather, H. A.; Jhala, D.; Vasita, R., Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2019**, *103*, 109761.
20. De Santis, R.; Guarino, V.; Ambrosio, L., Composite biomaterials for bone repair. In 2019; pp 273-299.
21. Futrega, K.; Music, E.; Robey, P. G.; Gronthos, S.; Crawford, R. W.; Saifzadeh, S.; Klein, T. J.; Doran, M. R., Characterisation of ovine bone marrow-derived stromal cells (oBMSC) and evaluation of chondrogenically induced pellets for cartilage tissue repair. *bioRxiv* **2020**, 2020.05.15.094847.
22. Jäger, M.; Herten, M.; Fochtmann, U.; Fischer, J.; Hernigou, P.; Zilkens, C.; Hendrich, C.; Krauspe, R., Bridging the gap: Bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *Journal of Orthopaedic Research* **2011**, *29*, (2), 173-180.
23. Šponer, P.; Filip, S.; Kučera, T.; Brtková, J.; Urban, K.; Palička, V.; Kočí, Z.; Syka, M.; Bezrouk, A.; Syková, E., Utilizing Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Tricalcium Phosphate Scaffold in Human Bone Defects: A Prospective, Controlled Feasibility Trial. *BioMed Research International* **2016**, 2016, 2076061.
24. Gómez-Barrena, E.; Padilla-Eguiluz, N.; Rosset, P.; Gebhard, F.; Hernigou, P.; Baldini, N.; Rouard, H.; Sensebé, L.; Gonzalo-Daganzo, R.-M.; Giordano, R.; García-Rey, E.; Cordero-Ampuero, J.; Rubio-Suárez, J. C.; García-Simón, M. D.; Stanovici, J.; Ehrnthaller, C.; Huber-Lang, M.; Flouzat-Lachaniette, C. H.; Chevallier, N.; Donati, D. M.; Spazzoli, B.; Ciapetti, G.; Fleury, S.; Fernandez, M.-N.; Cabrera, J.-R.; Avendaño-Solá, C.; Montemurro, T.; Panaitescu, C.; Veronesi, E.; Rojewski, M. T.; Lotfi, R.; Dominici, M.; Schrezenmeier, H.; Layrolle, P., Early efficacy evaluation of mesenchymal stromal cells (MSC) combined to biomaterials to treat long bone non-unions. *Injury* **2020**, *51*, S63-S73.