

**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**

Na całym świecie systematycznie rośnie liczba ludzi cierpiących z powodu urazów kości spowodowanych wypadkami komunikacyjnymi, złamaniami osteoporotycznymi, chorobami układu kostnego, czy resekcjami guzów. Pomimo zdolności tkanki kostnej do samoregeneracji, około 10-20% złamań zrasta się nieprawidłowo lub wcale, co może prowadzić do powstania ubytków o krytycznych rozmiarach, większych niż 1-2 cm długości i 50% obwodu kości. Obecnie pozostają one najtrudniejszym problemem w chirurgii ortopedycznej, a także ogromnym obciążeniem ekonomicznym dla systemu opieki zdrowotnej, mimo nowoczesnych metod leczenia o wysokich standardach technologicznych.

Współczesne metody terapeutyczne dużych ubytków kostnych opierają się na przeszczepieniach kości, w tym autoprzeszczepach, alloprzeszczepach oraz przeszczepach syntetycznych. Jednakże, w przypadku krytycznych ubytków kości, autologiczne przeszczepy kostne nie mają zastosowania z uwagi na ograniczoną możliwość pobrania tkanki kostnej, natomiast łatwo dostępne alloprzeszczepy mogą wywołać odpowiedź immunologiczną. Z kolei przeszczepy syntetyczne są dostępne nieograniczenie, ale proces osteointegracji implantu jest spowolniony, a sam materiał nie posiada właściwości osteogennych. W związku z tym poszukiwane są nowe, alternatywne metody leczenia, wśród których obiecującym podejściem jest zastosowanie konstruktów inżynierii tkankowej, składających się z bioimplantu z komórkami o właściwościach osteogennych oraz czynników biologicznie aktywnych.

Koniec ubiegłego stulecia przyniósł dynamiczny rozwój badań dotyczących biologii mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) oraz ich potencjalnego zastosowania w medycynie regeneracyjnej. MSC budzą zainteresowanie z uwagi na ich zdolność do wieloliniowego różnicowania, w tym osteogennego. Jednakże, regeneracja dużych ubytków kostnych z wykorzystaniem jedynie terapii komórkowych często kończy się niepowodzeniem, ponieważ brakuje matrycy, na której komórki mogą tworzyć struktury 3D, jak to ma miejsce w przypadku ich naturalnego środowiska w tkance. Problem ten może zostać rozwiązany poprzez stworzenie konstruktów inżynierii tkankowej, składającego się z biokompatybilnego rusztowania oraz MSC o zwiększonym potencjale osteogennym.

Celami rozprawy doktorskiej były: 1) charakterystyka biologiczna mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego owiec (BM-MSC); 2) ocena efektu stymulacji osteogennej komórek BM-MSC z użyciem cytokin FGF-2

i BMP-2; 3) charakterystyka właściwości osteogennych konstruktów rusztowanie-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.

Rozprawę doktorską stanowi cykl prac powiązanych tematycznie w postaci trzech publikacji naukowych. Wyniki badań zostały przedstawione w dwóch oryginalnych publikacjach, natomiast w publikacji przeglądowej podsumowano aktualny stan wiedzy o zastosowaniu MSC, rusztowań komórkowych oraz czynników biologicznie aktywnych w regeneracji tkanki kostnej.

Pierwsza publikacja (IJMS, 2020, 21(24):9726) obejmuje badania właściwości biologicznych owczych BM-MSC, które dotychczas były niedostatecznie scharakteryzowane. Ponadto, oceniono wpływ FGF-2 i BMP-2 na potencjał osteogenny BM-MSC *in vitro*. Badania podstawowe obejmowały ocenę fenotypu, morfologii, proliferacji, zdolności do różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej oraz profilu wydzielniczego owczych BM-MSC w warunkach kontrolnych oraz po stymulacji FGF-2 lub FGF-2 w kombinacji z BMP-2. W celu zbadania wpływu cytokin na zdolność BM-MSC do różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej, oceniono obecność białek związanych z osteogenezą: kolagenu I oraz osteokalcyny za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego, a także przeanalizowano poziom ekspresji mRNA genów kodujących białka wczesnych etapów różnicowania osteogennego: BMP-2, Runx2, osterix, kolagen typu I oraz późnych markerów osteogenezy: osteokalcyny i osteopontyny. Wykazano, że komórki MSC wyizolowane ze szpiku kostnego owiec, prekondycjonowane FGF-2 i BMP-2, zachowały swoje pierwotne właściwości komórek MSC, co potwierdzono obecnością markerów powierzchniowych CD73, CD90 i CD105 oraz brakiem ekspresji markerów komórek hematopoetycznych CD34, CD45 i antygenu głównego układu zgodności tkankowej klasy II (DR). Stymulowanie cytokinami skutkowało wydajniejszym tempem proliferacji, w porównaniu z komórkami nietraktowanymi. Zaobserwowano synergistyczne działanie pro-osteogenne FGF-2 i BMP-2 na BM-MSC, potwierdzone barwieniem depozytów wapniowych za pomocą czerwieni alizarinowej oraz zwiększoną intensywnością fluorescencji białek osteogennych: kolagenu I i osteokalcyny. Ponadto, stymulacja komórek BM-MSC cytokinami FGF-2 i BMP-2 indukowała wzrost poziomu ekspresji mRNA genów wszystkich analizowanych markerów osteogennych. Wykazano również, że owcze BM-MSC produkowały czynniki bioaktywne, w tym zaangażowane w osteogenezę (np. dekorynę), a stymulacja komórek FGF-2 i BMP-2 modulowała ich profil wydzielniczy.

W drugiej publikacji (Cells, 2022, 11(21):3446) opracowano konstrukt inżynierii tkankowej, składający się z rusztowania PCL/HAP/ β -TCP pokrytego warstwą n-HAP (wyprodukowanego na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej) i owczych BM-MSC, traktowanych/ lub nie FGF-2 i BMP-2. Badano wpływ FGF-2 i BMP-2 na potencjał osteogeny komórek hodowanych na rusztowaniu *in vitro* i *in vivo* w eksperymentalnym modelu owcy. Badania *in vitro* wykazały, że prekondycjonowanie komórek FGF-2 i BMP-2 zwiększało ich zdolność do osadzania się i proliferacji na rusztowaniu kompozytowym. Za pomocą barwienia czerwienią alizarinową, oceny aktywności ALP oraz poziomu ekspresji markerów osteogennych, wykazano, że BM-MSC hodowane na rusztowaniu i traktowane obiema cytokinami mają zdecydowanie większą zdolność do różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej niż w przypadku braku suplementacji medium hodowlanego. Pilotażowe badania *in vivo* (procedury chirurgiczne zostały wykonane na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu) pokazały, że wytworzony konstrukt inżynierii tkankowej był biokompatybilny z tkankami owcy i indukował regenerację kości, co potwierdzono obecnością białek osteogennych kolagenu I i osteokalcyny w obrębie wszczepionego bioimplantu oraz brakiem podwyższonego poziomu cytokin prozapalnych w surowicach owiec po operacjach chirurgicznych.

Trzecia publikacja (Cells 2021, 10(8):1925) opisuje kompleksowy proces tworzenia konstruktów biologicznie czynnych w inżynierii tkanki kostnej. Praca podsumowuje najnowsze osiągnięcia w zastosowaniu MSC, różnego rodzaju rusztowań komórkowych (ceramicznych, polimerowych, czy kompozytowych) oraz cytokin wspomagających osteogenezę w regeneracji kości. Ponadto, przedstawiono przykłady przedklinicznych badań *in vivo* na zwierzętach oraz badania kliniczne z ostatniej dekady.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji doktorskiej wykazały, że stymulacja owczych BM-MSC cytokinami FGF-2 i BMP-2 zwiększała ich potencjał osteogeny w hodowli standardowej 2D, jak również 3D z wykorzystaniem rusztowania kompozytowego. Badany biomateriał wspierał adhezję i proliferację BM-MSC, a ponadto był biokompatybilny, co potwierdzono badaniami *in vivo*. Pilotażowe badania nad implantacją konstruktów rusztowanie-BM-MSC do tkanek owcy wskazały na korzystny efekt indukcji osteogennej w obszarze wszczepionego bioimplantu. Podsumowując, przeprowadzone badania interdyscyplinarne wykazały, że zastosowany konstrukt inżynierii tkankowej posiada właściwości proosteogenne i może przynieść oczekiwane efekty terapeutyczne w naprawie dużych ubytków kostnych.