

# UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

## Katedra i Klinika Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu dla Dorosłych i Dzieci

50-556 Wrocław, ul. Borowska 213  
tel. 71/734-32-00, fax. 71/734-32-09

Recenzja<sup>1</sup>

rozprawy doktorskiej mgr **Sandry Darii Stannitz**

pt.

„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 świecie diagnozowanych jest każdego roku ok 150 milionów nowych złamań, z których nawet 20% ulega zaburzeniom lub brakowi zrrostu. Zdecydowana większość złamań leczona jest nieoperacyjnie z zastosowaniem, po odpowiedniej repozycji, czasowego unieruchomienia. Złamania niestabilne wymagają jednak leczenia operacyjnego, które wykonywane jest przez otwartą lub zamkniętą repozycję z wykorzystaniem przykostnych, śródszpikowych lub zewnętrznych systemów stabilizacji. Złamaniom masywnym, wysokoenergetycznym, często towarzyszą ubytki tkanki kostnej, powstające głównie w wyniku zmiążdżeniowego urazu beleczkowego. Jest to zjawisko trudne w leczeniu, zwłaszcza jeśli towarzyszą mu urazy tkanki chrzęstnej i często zaburzenia kongruencji stawów co w funkcji czasu przekłada się na rozwój zmian zwyrodnieniowych. Problem dotyczy wszystkich stawów, ale największe skutki u człowieka niesie dla dużych stawów kończyny dolnej, a u zwierząt dla wszystkich dużych stawów kończyn. Problem ten jest jednym z największych problemów diagnostyczno-leczniczych obecnej medycyny i stanowi poważny problem społeczny i ekonomiczny.

---

<sup>1</sup> Recenzja została sporządzona na podstawie dostarczonej dokumentacji w związku z postępowaniem Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, w sprawie nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne mgr Sandrze Darii Stannitz w oparciu o kryteria określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018r. (Dz.U. 2020 poz. 85 z późn. zm.).

Artroza wiąże się z przewlekłym, nawrotowym bólem. Często powoduje różnego stopnia wykluczenie społeczne, ograniczając aktywność życia codziennego. Wpływa na pogorszenie ogólnego stanu zdrowia, w tym rozwój chorób układu sercowo-naczyniowego.

Ostatnie kilkadziesiąt lat przyniosło istotny postęp technologiczny w ortopedii, dzięki czemu leczenie złamań kości i choroby zwyrodnieniowej stawów stało się skuteczne. Wprowadzenie nowych metod leczenia i technik operacyjnych, pozwala na powrót do normalnego funkcjonowania wielu pacjentom. Często wiąże się jednak ze stosowaniem implantów metalowych lub przeszczepów kostnych allo- lub autogennych. Stosowanie implantów metalowych, takich jak augmenty czy endoprotezy jest powszechne, ale jest leczeniem ostatecznym, nieoszczędzającym tkanki kostnej i obciążonym szeregiem możliwych powikłań, i reakcji zarówno miejscowych jak i ogólnoustrojowych. Dostęp do przeszczepów kostnych autologicznych jest ograniczony podażą łożyska kostnego pacjenta oraz wiąże się z częstymi dolegliwościami bólowymi i zaburzeniami gojenia w miejscu pobrania. Z kolei nieliczne banki tkankowe w Polsce, nie są w stanie zapewnić wystarczającej ilości przeszczepów kostnych allogennych, które mogłyby pokryć zapotrzebowania współczesnej ortopedii i dziedzin pokrewnych w przypadkach urazowych, ale także, co wydaje się stanowić większym problemem, w przypadkach planowych zabiegów endoprotezoplastyk w sytuacjach dużych ubytków kostnych.

W związku z tym stanem rzeczy możliwości zastosowania technik łączonych z zastosowaniem biomateriałów i technik biostymulujących są szeroko dyskutowane zarówno przez naukowców z dziedziny bioinżynierii i biomechaniki, jak i samych lekarzy praktyków.

Dlatego też z uznaniem należy przyjąć podjęcie przez mgr Sandrę Darię Stamnitz badań w tym zakresie. Oceniana rozprawa doktorska, powstała pod patronatem naukowym wybitnych specjalistów w tej dziedzinie, doświadczonych badaczy i klinicystów, prof. dr hab. Aleksandry Klimczak i prof. dr hab. Zdzisława Kielbowicza.

Przesłaną do recenzji rozprawę doktorską mgr Sandry Darii Stamnitz pt. „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” stanowi cykl prac powiązanych tematycznie w postaci trzech publikacji naukowych.

Wyniki zostały przedstawione w dwóch pracach oryginalnych, natomiast w jednej publikacji przeglądowej autorka podsumowała aktualny stan wiedzy o rusztowaniach komórkowych, zastosowaniu MSC i czynnikach biologicznie aktywnych w regeneracji kości. Całość prac wraz z wymaganą przepisami oprawą stanowi druk, który liczy 112 stron.

W skład cyklu publikacji wchodzi:

1. „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.
2. “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.
3. „Mesenchymal Stem Cells, Bioactive Factors, and Scaffolds in Bone Repair: From Research Perspectives to Clinical Practice”, *Cells* 2021.

Streszczenie w języku polskim znajduje się na stronach 6-8, streszczenie w języku angielskim na stronach 9-11, lista publikacji na stronie 12. Na stronach 13-31 znajdują się deklaracje współautorów, na stronach 32-111 załączone są publikacje, które wchodzi w skład cyklu prac. Stronę 112. stanowią wnioski.

Celem pracy doktorskiej była:

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 heterotropowej implantacji do tkanek w okolicy zuchwy owcy.

Badania przeprowadzone w ramach recenzowanej pracy doktorskiej to badania interdyscyplinarne, z pogranicza biologii, weterynarii, chemii materiałowej i medycyny regeneracyjnej. Realizacja badań przebiegała w czterech częściach i została przedstawiona w dwóch pracach oryginalnych. Pierwsze dwa cele realizowane były w ramach pracy „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. Cele 3. i 4. w ramach pracy “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.

W przedstawionych badaniach dokonano klasyfikacji komórek stymulowanych FGF-2 lub połączeniem FGF-2 i BMP-2, wyizolowanych ze szpiku owiec według kryteriów ISCT i wykazano, że owcze BM-MSC stymulowane w kierunku osteogennym utrzymują typowy dla MSC fenotyp w hodowli długoterminowej i posiadają zdolność do różnicowania osteogennego, chondrogenego i adipogenego. Stwierdzono, że FGF-2 ma większy wpływ na tempo proliferacji a BMP-2 jest stymulatorem różnicowania osteogennego. Autorka wykazała również, że powyższe cytokiny oprócz zwiększania potencjału osteogennego na każdym etapie tworzenia kości, wpływały na profil wydzielniczy BM-MSC, regulując różnicowanie osteogenne, proangiogenne i immunomodulujące.

Wykazano również, że FGF-2 i BMP-2 zwiększają potencjał adhezyjny i proliferacyjny BM-MSC owiec hodowanych na rusztowaniu PCL/HAP/ $\beta$ -TCP pokrytym nanohydroksyapatytem. Ponadto FGF-2 i BMP-2 dodane do medium osteogennego najbardziej zwiększały potencjał osteogenny BM-MSC, oceniany na podstawie barwienia czerwienią alizarinową i aktywności ALP. Jednocześnie hodowanie BM-MSC w medium  $\alpha$ MEM z FGF-2 i BMP-2 zwiększało ekspresję genów markerów osteogennych.

Badania *in vivo* przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały, że BM-MSC owcy charakteryzują się aktywnością parakrynną, modulują środowisko lokalne, przyspieszają procesy regeneracyjne i łagodzą odpowiedź zapalną, a badany konstrukt rusztowanie-BM-MSC wykazywał biokompatybilność i potencjał proosteogeny.

Autorka wskazała również, że mimo zdolności różnicowania w osteogenne komórki progenitorowe i stymulacji osteogenezy przez aktywność parakrynną, MSC same nie są w stanie pokryć dużych ubytków kostnych.

## Wnioski:

1. Komórki wyizolowane ze szpiku kostnego owiec, suplementowane FGF-2 lub 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 owoczych BM-MSC oraz modulowały ich profil wydzielniczy.
3. Owce MB-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. Konstruktor złożony z rusztowania PCL/HAP/ $\beta$ -TCP pokrytego nHAP oraz autologicznych BM-MSC, traktowanych FGF-2 lub BMP-2 w połączeniu z BMP-2, był biokompatybilny z tkankami owcy oraz korzystnie wpływał na regenerację tkanki kostnej w zuchwie owiec, stanowiąc tym samym obiecującą strategię do zastosowania klinicznego w naprawie dużych ubytków kostnych.

## Za oryginalne osiągnięcia Doktorantki uważam:

1. Dogłębną analizę wpływu FGF-2 lub BMP-2 na długoterminowe zachowanie fenotypu natywnych MSC pochodzenia owczego,
2. Analizę wpływu FGF-2 lub BMP-2 na potencjał osteogeny i profil wydzielniczy owoczych BM-MSC,
3. Analizę biokompatybilności konstruktora PCL/HAP/ $\beta$ -TCP pokrytego nHAP i autologicznych BM-MSC z tkankami owcy oraz jego wpływu na regenerację tkanki kostnej.

Opiniowana praca jest próbą wnikięcia w złożone, trudne i wieloaspektowe problemy związane z technikami łączonymi z zastosowaniem biomateriałów i technik biostymulujących oraz ich możliwości zastosowania w leczeniu ubytków kostnych. Przeprowadzenie tych badań wymagało wcześniejszego doświadczenia przedklinicznego, klinicznego i dużego nakładu pracy. Na szczególnie uznanie zasługuje sposób przygotowania teoretycznego i odniesienie wyników badań do wyników uzyskanych przez innych autorów oraz przeprowadzenie dogłębnej analizy statystycznej uzyskanych wyników.

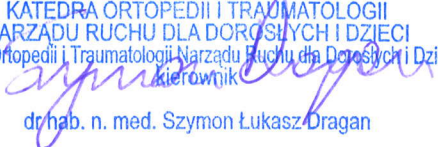
Na zakończenie recenzji pozwalam sobie na zadanie pytania nasuwającego się podczas studiowania pracy:

1. Czy na podstawie uzyskanych wyników i własnych doświadczeń Doktorantka może zaproponować dalsze etapy działań naukowych, które mogłyby prowadzić do aplikacji klinicznej badanych biomateriałów wspomaganych technikami biostymulacji?

W mojej ocenie, poruszany przez Doktorantkę, problem jest niezwykle istotny klinicznie, ze względu na wagę społeczną problemu ubytków kostnych powstających pourazowo jak i w przebiegu zmian o charakterze zwyrodnieniowym. Biorąc pod uwagę ograniczoną dostępność allogennych preparatów kostnych, problemy związane z pozyskiwaniem przeszczepów autogennych i znaczny koszt preparatów kościozastępczych, badania nad możliwością zastosowania biomateriałów i technik biostymulujących w sytuacji ubytku kostnego są niezwykle istotne.

Reasumując swoją recenzję stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Sandry Darii Stannitz pt. „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” jest bardzo wartościowa, przedstawia bardzo duże walory poznawcze i praktyczne oraz spełnia kryteria określone w ustawie art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018r. (Dz.U. 2020 poz. 85 z późn. zm.). W tym przekonaniu przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu wniosek o przyjęcie pracy i dopuszczenie rozprawy doktorskiej mgr Sandry Darii Stannitz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze wagę poruszanego problemu i nieczęste tak szerokie spojrzenie na przedmiotowy problem, stawiam również wniosek o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej.

Wrocław, 24 lutego 2023 roku

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
we Wrocławiu  
KATEDRA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII  
NARZĄDU RUCHU DLA DOROSŁYCH I DZIECI  
Klinika Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu dla Dorosłych i Dzieci  
kierownik  
  
dr hab. n. med. Szymon Łukasz Dragan