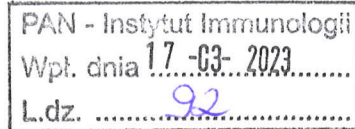




Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Platforma Badań Translacyjnych w zakresie medycyny regeneracyjnej
dr hab. Anna Sarnowska, prof. IMDiK, Kierownik

tel.: 48 22 608 65 98
e-mail: asarnowska@imdik.pan.pl



Warszawa, 10.03.2023

Kierownik Platformy Badań Translacyjnych
w zakresie medycyny regeneracyjnej
Dr hab. Anna Sarnowska, prof. IMDiK

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sandry Darii 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”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Sandry Darii Stannitz została wykonana w ramach Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich BioTechNan w dwóch ośrodkach: w Samodzielnym Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN pod kierunkiem Profesor dr. hab. Aleksandry Klimczak oraz w Katedrze i Klinice Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem Profesora dr. hab. Zdzisława Kielbowicza.

Rozprawa jest spójnym zbiorem tematycznym trzech artykułów: dwóch oryginalnych i jednego przeglądowego, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, znajdujących się na liście JRC i wysoko punktowanych w strukturze oceny Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich trzech prac: „Characteristics and Osteogenic Differentiation of Ovine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulated with FGF-2 and BMP-2” opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences (IF 5.924), oraz dwóch opublikowanych w Cells (IF 7.666) „Osteogenic Potential of sheep Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with BMP-2 and FGF-2 and Seeded on sn HAP-Coated PCL/HAP/B-TCP Scaffold” i „Mesenchymal Stem Cells, Bioactive Factors, and Scaffolds in Bone Repair: From Research Perspectives to Clinical Practice”. Z oświadczeń współautorów

dołączonych do dokumentacji wynika, że Jej wkład w powstanie każdej z prac stanowił 60%.

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy na stopień doktora nauk medycznych jest ocena możliwości zastosowania konstruktów składającego się z rusztowania 3D zasiedlonego mezenchymalnymi komórkami macierzystymi/stromalnymi, w celu optymalizacji leczenia rozległych ubytków kostnych. Doktorantka w tym celu wyizolowała i scharakteryzowała owcze BM-MSC. Następnie poddała je stymulacji czynnikami proosteogennymi i przeanalizowała zmiany jakie zaszły w morfologii oraz zdolnościach wydzielniczych wymienionych komórek. Tak prekondukcjonowanymi komórkami zostały zasiedlone rusztowania 3D o specjalnie dobranym składzie. W ostatnim etapie doświadczeń doktorantka wszczepiła otrzymane konstrukty do kości twarzoczaszki owcy. Należy podkreślić, że projekt przedstawiony w rozprawie doktorskiej jest wysoce aplikacyjny i odpowiada na realne zapotrzebowanie kliniczne.

Rozprawa posiada formę zszywkii, w której wymienione publikacje poprzedzone są bardzo krótkim (trzy-stronicowym) opisem w języku polskim. Do pracy został dołączony 20-stronicowy autoreferat, obejmujący: szersze niż w rozprawie doktorskiej wprowadzenie, wyszczególnione cele pracy, omówienie wyników, wnioski oraz dorobek naukowy doktoranta. Załączony autoreferat, zgodnie z regulaminem jednostki, nie podlegał ocenie merytorycznej, ale znacznie ułatwił zapoznanie się zarówno z sylwetką doktoranta, jak i z tokiem prowadzonych doświadczeń.

Poniższa recenzja zawiera ocenę wartości merytorycznej całości pracy doktorskiej oraz zgodności założeń i tematu z osiągnięciami końcowymi, doboru literatury, metod badawczych, wyników pomiarów oraz ich analizy, a nie stanowi oceny merytorycznej poszczególnych publikacji.

Struktura podziału treści pracy, jak również kolejność rozdziałów nie jest typowa, co związane jest częściowo z formą spinki, a częściowo z niespójnymi kryteriami dla tej formy doktoratu, obowiązującymi na różnych uczelniach.

Recenzowana praca zawiera 112 strony maszynopisu, w tym stronę tytułową, spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, listę publikacji ujętych w spince, kopie publikacji oraz wnioski. Rozprawę uzupełniają załączniki zawierające oświadczenia

wszystkich współautorów publikacji określające indywidualny udział (merytoryczny i procentowy) każdego z nich w powstaniu publikacji. Streszczenia zamieszczone w języku polskim i angielskim przedstawione są w sposób zwięzły, ale bardzo komunikatywny i umożliwiają szybkie zapoznanie się z problematyką i wynikami pracy. Tekst jest napisany poprawną polszczyzną i starannie edytowany — znalazłam zaledwie parę drobnych literówek i kilka niezręczności stylistycznych.

Zwraca jednak uwagę pewna niespójność dotycząca języka pracy. Strona tytułowa została przedstawiona w dwóch językach: polskim i angielskim, kolejno: informacja o ośrodkach w których prowadzono badania tylko w języku polskim, następnie spis treści tylko w języku angielskim, streszczenie ponownie w dwóch językach, lista publikacji, deklaracje współautorów, załączone publikacje i wnioski tylko w języku angielskim. Nie jest to zarzut dla omawianej pracy, tylko raczej kwestia ustalenia spójnego regulaminu przez jednostki kształcające.

Na początku pracy brakuje również wykazu stosowanych skrótów, który wyprzedzałby streszczenie. Skróty są wyjaśnione w poszczególnych publikacjach, ale umieszczenie ich na etapie czytania streszczenia byłoby pomocne dla czytelnika.

Trzy-stronicowe streszczenie zawiera krótki wstęp, cel rozprawy, omówienie wyników przedstawionych w kolejności załączonych prac oraz wnioski.

Cel pracy składa się z czterech celów szczegółowych: 1) charakterystyki biologicznej mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego owiec (BM-MSC); 2) oceny efektu stymulacji osteogennej komórek BM-MSC z użyciem cytokin FGF-21 BMP-2; 3) charakterystyki właściwości osteogennych konstruktów rusztowanie-BM-MSC stymulowanych FGF-2 i BMP-2 in vitro oraz 4) oceny biokompatybilności i potencjału osteogennego konstruktów rusztowanie-BM-MSC po heterotopowej implantacji do tkanek w okolicy żuchwy owcy.

Zarówno cel jak i zakres badań, w powiązaniu z wynikami innych autorów, zostały w rozprawie określone jednoznacznie.

Opis metodologii i przedstawione wyniki zostały w poszczególnych publikacjach przedstawione odpowiednio dokładne i umożliwiają innym badaczom powtórzenie badania w celu weryfikacji wyników na innym materiale.

Sposób opisu wyników oraz dalsza ich interpretacja wskazuje, że doktorantka swobodnie i z dużą wiedzą porusza się w tej dziedzinie. Interpretując wyniki, Doktorantka wykazała się dużą znajomością literatury w omawianej dziedzinie.

Cytowane piśmiennictwo zawiera wybrane dane dotyczące przedmiotu badań, w tym również najnowsze pozycje.

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorantka sformułowała 4 wnioski, które stanowią logiczne podsumowanie uzyskanych wyników. Doktorantka stwierdziła, że: 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 osteogenny owczych BM-MSCs oraz modulowały ich profil wydzielniczy; 3) owcze BM-MSCs traktowane FGF-2 i BMP-2, umieszczone na rusztowaniu PCL/HAP B-TCP pokrytym nHAP, miały zdecydowanie większy potencjał adhezyjny i osteogenny w porównaniu z komórkami traktowanymi samym FGF-2 lub nietraktowanymi; 4) konstrukcja złożony z rusztowania PCL/HAP/B-TCP pokrytego nHAP oraz autologicznych BM-MSCs, 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. Przedstawione na zakończenie pracy wnioski zawierają odpowiedź na przedstawione w streszczeniu cele.

W tekście dostrzeżono jedynie kilka drobnych uchybień merytorycznych i językowych.

Zgodnie z najnowszym, zrewidowanym stanowiskiem ISCT (Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature 2019), nazwa mezenchymalne komórki macierzyste powinna być stosowana jedynie po wykonaniu eksperymentów *in*

vitro i *in vivo* potwierdzających ich macierzystość, w tym *in vitro* ocenę potencjału klonogenego (CFU-F) i testy różnicowania trójliniowego. Sama zdolność do tworzenia kolonii wskazuje na status progenitorowy komórek, ale jest niewystarczająca do wykazania zdolności do samoodnawiania przy braku danych *in vivo*. W związku z brakiem takich wyników w przedstawionej pracy, zalecałabym stosowanie nazwy mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne.

Przy nazewnictwie białek i genów, doktorantka zastosowała poprawną pisownię (nazwy genów napisane są pochyłymi literami, białek – normalną czcionką). Jedynie dla genu dla białka powierzchniowego CD90 doktorantka zrobiła wyjątek i wszędzie napisała normalną czcionką. Czy był ku temu specjalny powód? Ponadto przyjęto ogólnie, że nazwy genów i białek ludzkich piszemy dużymi literami w przeciwieństwie do nazw genów i białek zwierzęcych. Zarówno w streszczeniu, jak i w publikacjach, ta reguła jest pominięta i raz nazwy są wymienione z dużych liter (w tabeli), raz z małych lub w sposób mieszany (w streszczeniu).

Po przeczytaniu prac pojawia się również kilka pytań merytorycznych.

Przedstawione publikacje poruszają bardzo ważny z punktu klinicznego problem gojenia kości. W streszczeniu doktorantka porusza zdolność do samoregeneracji układu kostnego. W literaturze istnieją dane dotyczące innego przebiegu odnowy po urazach kości u dzieci do 6 r.ż. (bez śladu urazu) i u osób po tym wieku. Czy doktorantka spotkała się z takimi doniesieniami?

W streszczeniu doktorantka nadmienia, że autologiczne przeszczepy kostne nie mają zastosowania z uwagi na ograniczoną możliwość pobrania tkanki kostnej. Jednakże warto zwrócić uwagę, że od tej zasady istnieją wyjątki. W chirurgii rekonstrukcyjnej/transplantacyjnej u dzieci, do uzupełnienia rozległych ubytków najczęściej wykorzystywane są autologiczne fragmenty kostne pobrane od pacjenta. Miejsce pobrania fragmentu kostnego stanowi najczęściej talerz kości biodrowej, ale czasem również czaszka, kość piszczelowa oraz miejsce spojenia żuchwy. Niestety pobranie fragmentu kostnego od pacjenta często wiąże się z deformacją kostną powstałą w miejscu pobrania tkanki, a czasem również wpływa na zaburzenie przyczepu mięśni do struktury, z której został pobrany fragment. Istnieją również inne, najczęściej czasowe,

niepożądane skutki transplantacji takie jak np.: zespół bólowy, problemy z motoryką. Dodatkowym negatywnym aspektem autologicznej transplantacji jest zwiększone ryzyko złamań kości, w miejscu, z którego został pobrany fragment (Secondary Alveolar Bone Grafting: the Dilemma of Donor Site Selection and Morbidity, 2008), stąd też tak ważne jest poszukiwanie materiałów i metod umożliwiających zastąpienie przeszczepów autologicznych.

Również podniesiony w streszczeniu został problem braku właściwości osteogennych implantów. Warto nadmienić, że w stomatologii stosowane są obecnie materiały na bazie hydroksyapatytu, pokryte kolagenem I, które wykazują silne działanie osteoindukcyjne i mogą sprzyjać tworzeniu się nowej kości (Wong RW, Rabie AB. Open Biomed Eng J. 2010 Mar 9;4:71-6; Mao Y I wsp. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Sep 20;10:976499).

Dość ciekawą obserwacją przedstawioną w pracy jest obniżenie się ekspresji genu dla białka CD90 (białka charakterystycznego dla MSC) po stymulacji osteogennej komórek BM-MSK z użyciem cytokin FGF-2 i BMP-2, przy jednoczesnym braku zmian w dwóch równorzędnych białkach CD105 i CD73? Jak powyższą obserwację interpretuje doktorantka?

Również coraz częściej dyskutowana jest rola osteopontyny w procesach chorobowych zwłaszcza z towarzyszącym stanem zapalnym. Czy zmiana poziomu osteopontyny obserwowana przez doktorantkę może nie być bezpośrednio związana z procesem regeneracji kości tylko interwencją z zastosowaniem MSC i rusztowania 3D (interwencją zewnętrzną)?

Ostatnie pytanie dotyczy zastosowania GAPDH jako genu referencyjnego. Skąd wybór tego właśnie genu, czy doktorantka sprawdziła rozrzut jego ekspresji w MSC i MSC po stymulacji osteogennej z użyciem cytokin FGF-2 i BMP-2 ? Czy były brane pod uwagę inne geny referencyjne?

Przedstawione powyżej nieliczne, drobne uwagi nie umniejszają wartości pracy doktorskiej. Przedstawiona praca nie budzi żadnych wątpliwości co do oryginalności.



Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Platforma Badań Translacyjnych w zakresie medycyny regeneracyjnej
dr hab. Anna Sarnowska, prof. IMDiK, Kierownik

tel.: 48 22 608 65 98
e-mail: asarnowska@imdik.pan.pl

Tematyka badawcza rozprawy doktorskiej Pani mgr Sandry Darii Stannitz jest oryginalna, zagadnienie ważne poznawczo, a treść pracy odpowiada tematowi określoneemu w tytule. Na uznanie zasługuje rzetelna dyskusja otrzymanych wyników w oparciu o aktualne i należycie wykorzystane źródła literaturowe.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn.zm.) i wnoszę o dopuszczenie mgr Sandry Darii Stannitz do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej przed Radą Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Ze względu na wartość merytoryczną zweryfikowaną ich opublikowaniem w recenzowanych czasopismach naukowych, znajdujących się na liście JRC i wysoko punktowanych w strukturze oceny Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz biorąc pod uwagę dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki (4 publikacje o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 25, kierowanie projektem ExCELLent, udział w 2 projektach finansowanych przez NCBIr oraz NCN, 9 doniesień konferencyjnych) wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji rozprawy.

INSTYTUT MEDYCyny
DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
im. Mirosława Mossakowskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Platforma Badań Translacyjnych
w zakresie Medycyny Regeneracyjnej
02-106 Warszawa, ul. A. Mossakowskiego 5
Tel. 22 60 86 59 8

Platforma Badań Translacyjnych
w zakresie Medycyny Regeneracyjnej
KIEROWNIK


dr hab. n. med. Anna Sarnowska, prof. IMDiK