



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia ...17-03-2023...
L.dz. ...93...

Prof. dr hab. n. med. Ewa Zuba-Surma,  
Zakład Biologii Komórki  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. Gronostajowa 7  
30-387 Kraków  
e-mail: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl

Kraków, 13.03.2023r.

**RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr Sandry D. Stamnitz**

**pt. „Charakterystyka biologiczna mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCS)**

**pozyskanych ze szpiku kostnego owiec**

**oraz ocena efektywności zastosowania bioimplantu wzbogaconego w MSC**

**w rekonstrukcji dużych ubytków tkanki kostnej w eksperymentalnym modelu owcy"**

wykonanej pod kierunkiem

Promotorów: prof. dr hab. Aleksandry Klimczak oraz prof. dr hab. Zdzisława Kiełbowicza

w Samodzielnym Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Komórki macierzyste mezenchymalne/ stromalne (z ang. *mesenchymal stem/ stromal cells*; *MSCs*) od kilkudziesięciu lat stanowią przedmiot intensywnych badań na całym świecie, mających na celu m.in. poznanie ich właściwości funkcjonalnych istotnych z punktu widzenia naprawy tkankowej, w tym potencjału różnicowania oraz ich aktywności parakrynej, a przede wszystkim mechanizmów działania, które umożliwiłyby bardziej kierunkowane zastosowania kliniczne tych komórek w naprawie uszkodzeń tkankowych. Komórki MSCs stanowią obecnie populację komórek macierzystych (KM) o najszerszym wykorzystaniu w badaniach klinicznych z udziałem pacjentów, ze względu na ich proregeneracyjny potencjał biologiczny oraz bezpieczeństwo zastosowania, o których świadczą dziesiątki badań przeprowadzonych na całym świecie w modelach *in vitro* oraz w modelach zwierzęcych *in vivo*. Ze względu na ich endogenne właściwości adhezji do powierzchni stałych, komórki MSCs wykorzystuje się także szeroko w inżynierii tkankowej, gdzie w połączeniu z różnego

typu biomateriałami, mogą wchodzić w skład złożonych implantów stosowanych dla efektywniejszej regeneracji ubytków tkankowych. W tym kontekście nie tylko rodzaj zastosowanego biomateriału budującego implant, ale również ukierunkowane modulowanie potencjału różnicowania samych komórek MSCs do danego typu tkanki, mogą mieć istotne znaczenie dla efektywności terapeutycznej całego implantu po jego umieszczeniu w tkankach *in vivo*. Strategie inżynierii tkankowej, o których mowa powyżej, stanowią dziś jedną z gałęzi przyszłości w naprawie tkankowej.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Sandry D. Stannitz w pełni wpisuje się we wspomniane współczesne interdyscyplinarne trendy naukowe. Badania Doktorantki koncentrują się na badaniach właściwości biologicznych, w tym potencjału różnicowania komórek MSCs - pozyskanych ze szpiku kostnego owcy, w szczególności w kierunku tkanki kostnej, w różnych warunkach modulujących ten potencjał *in vitro*, jak również na łączeniu tych komórek z biomateriałami, które mogłyby zostać wykorzystane w budowie implantów i naprawie ubytków tkanki kostnej w warunkach *in vivo*. W swojej pracy Doktorantka zbadała m.in. istotny aspekt wpływu wybranych czynników wzrostowych uczestniczących w procesach osteogenezy (w tym czynników FGF-2 oraz BMP-2) na wybrane funkcje komórek MSCs, w tym ich potencjał różnicowania osteogennego w warunkach *in vitro*. Zbadała także potencjał naprawczy tych komórek w połączeniu z implantem syntetycznym opartym o złożony biomateriał na bazie polikaprolaktonu (PCL/HAP/ $\beta$ -TCP) pokryty hydroksyapatytem (n-HAP) - po wszczepieniu do ubytków kostnych w dużym modelu zwierzęcym (owcy) *in vivo*.

Praca Doktorantki może stanowić istotny wkład w rozwój przyszłych, nowych podejść terapeutycznych w naprawie tkankowej, w tym w szczególności w leczeniu ubytków kostnych u pacjentów ortopedycznych.

W skład przedstawionej mi do recenzji rozprawy wchodzi trzy (3) spójne tematycznie artykuły naukowe, w tym dwie (2) prace oryginalne oraz jeden (1) artykuł przeglądowy, opublikowane w międzynarodowych recenzowanych czasopismach naukowych o wysokich współczynnikach oddziaływania (IF), w tym odpowiednio jeden w czasopiśmie *Int J of Mol Sci* (IF=5.924) oraz dwa artykuły w *Cells* (IF=7.666), co świadczy o uznanym poziomie przeprowadzonych badań, ocenionych również przez niezależnych recenzentów.

We wszystkich z trzech (3) wymienionych prac, w tym w obu publikacjach oryginalnych, gdzie Doktorantka prezentuje wyniki swoich badań, Pani mgr Sandra D. Stannitz jest pierwszą autorką - ze znaczącym, odpowiednio 60% i 50% udziałem Doktorantki w ich wykonaniu, co pozwala potwierdzić, że Doktorantka miała kluczowy wkład w przedstawione prace eksperymentalne oraz ich przygotowanie do publikacji. Doktorantka jest także pierwszym autorem w pracy przeglądowej (z 70% udziałem w jej powstaniu), we współautorstwie ze swoim Promotorką – Panią prof. dr hab. Aleksandrą Klimczak, która to publikacja podsumowuje dotychczasową wiedzę w obszarze badawczym, którym w

swojej pracy zajmowała się Doktorantka, tj. dotyczącym zastosowań komórek MSCs oraz rusztowań w naprawie ubytków kostnych, w tym z uwzględnieniem ich aplikacji w praktyce klinicznej.

Wkład Doktorantki w przedstawione do oceny prace jest wiodący i nie budzi wątpliwości. Został przy każdej z publikacji wykazany stosownym udziałem procentowym, potwierdzonym także przez pozostałych współautorów wspomnianych artykułów naukowych.

### **Ocena formalna pracy:**

Rozprawę doktorską rozpoczyna spis treści, a także Streszczenia w języku polskim oraz angielskim, w których Doktorantka w sposób zwięzły i informatywny przedstawia główne cele i osiągnięcia swojej pracy doktorskiej. Po nich następuje Lista publikacji (*List o publications*), które Doktorantka przedstawia do oceny oraz deklaracje Współautorów tych publikacji potwierdzające udział Doktorantki i każdej/ każdego z nich w powstanie danej publikacji. W dalszej kolejności Doktorantka umieściła pełne wersje wszystkich trzech (3) publikacji przedstawionych do oceny, wraz z materiałami umieszczonymi w Suplementach, a na zakończenie umieściła najważniejsze konkluzje płynące z tych prac (w 4 punktach zawartych w sekcji *Conclusions*).

Niezależnym załącznikiem do rozprawy doktorskiej jest 20-o stronicowy *Autoreferat* w języku polskim, w którym Doktorantka na tle wprowadzenia merytorycznego do tematyki jej rozprawy doktorskiej - przedstawiła cele swojej rozprawy i najważniejsze wyniki zawarte w w/w publikacjach oraz wnioski z nich płynące, jak również zaprezentowała swoją dotychczasową aktywność naukową i dorobek naukowy, wykraczający poza publikacje objęte rozprawą doktorską. Autoreferat kończy *Bibliografia*, obejmująca spis 24 pozycji literaturowych, do których Doktorantka odniosła się w tym załączniku.

Od strony formalnej rozprawa w przedstawionej formie spełnia w mojej ocenie wymogi stawiane tego typu pracom, stanowiącym cykl artykułów poświęconych danej tematyce i stanowi spójne dzieło zawierające wyniki badań eksperymentalnych Doktorantki, przedstawione w kontekście konkretnych celów jej badań oraz dotychczasowej wiedzy w obszarze badawczym.

### **Ocena merytoryczna:**

Ze względu na to, że zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowią artykuły naukowe, opublikowane już w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, które zostały poddane szczegółowej recenzji przez międzynarodowych ekspertów przed ich opublikowaniem - w tym w zakresie m.in. jakości, interpretacji i znaczenia prezentowanych wyników badań oraz stosowanej metodyki, moja ocena jako recenzenta rozprawy ma charakter dodatkowy. Ze swojej strony, po szczegółowym zapoznaniu się z przedstawionymi publikacjami Doktorantki, zaprezentowane wyniki badań oceniam bardzo wysoko.

W pierwszej z zaprezentowanych prac (Gromolak i wsp. *IJMS*, 2020, 21 (24):9726), Doktorantka skupiła się na ocenie fenotypu oraz podstawowych funkcji oraz potencjału różnicowania osteogennego komórek MSCs wyizolowanych ze szpiku kostnego owcy, w warunkach *in vitro*. W tym celu Doktorantka, we współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, pozyskiwała komórki pierwotne ze szpiku tych zwierząt, a następnie wyprowadzała hodowle komórek MSCs, które w kolejnym etapie poddawała długoterminowej hodowli w pożywkach o różnym składzie, w tym zawierających istotne czynniki wzrostowe mogące modulować procesy osteogenezy, jak bFGF oraz BMP-2. W swoich badaniach Doktorantka po raz pierwszy poddała analizie komórki pozyskane z tkanek owcy – zgodnie z kryteriami klasyfikacji komórek MSCs zalecanymi przez Międzynarodowe Towarzystwo Badań Komórkowych (ISCT). Wykazała m.in., że komórki te hodowane długoterminowo (do 21 dni) w pożywce kontrolnej oraz w obecności czynników FGF-2 i/lub BMP-2 utrzymują swój zasadniczy fenotyp komórek MSCs, zachowując potencjał do różnicowania w tkanki listka mezodermalnego. Wykazała także, że czynnik FGF-2 zwiększa tempo proliferacji tych komórek, natomiast czynnik BMP-2 zwiększa efektywność różnicowania osteogennego tych komórek w porównaniu z innymi stosowanymi pożywkami różnicującymi. Wykazała także wpływ w/w czynników wzrostowych na profil wydzielniczy komórek MSCs, w tym na produkcję cytokin związanych z osteogenezą, angiogenezą oraz immunomodulacją.

Na podkreślenie w mojej ocenie zasługuje fakt wykorzystania przez Doktorantkę unikatowego materiału zwierzęcego w jej badaniach, co umożliwiło nie tylko uzyskanie ważnych poznawczo wyników odnośnie wpływu FGF-2 oraz BMP-2 na potencjał osteogenny komórek MSCs, ale także bezpośrednie aplikowanie tych komórek w modelu regeneracji kości u dużych zwierząt (owiec), co ma ogromne znaczenie translacyjne, a co zostało przez Doktorantkę przeprowadzone w kolejnych badaniach. Tego typu unikatowy materiał badawczy stawia szereg wyzwań metodycznych, w tym w zakresie m.in. doboru stosownych pożywek oraz specyficznych narzędzi m.in. do oceny fenotypu komórek (w tym przeciwciał rozpoznających antygeny komórek owcy) oraz ekspresji genów (tj. m.in. starterów specyficznych do oceny transkryptów pochodzenia owczego). W mojej ocenie Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z tym wyzwaniem, co umożliwiło jej szybkie zastosowanie uzyskanych wyników w badaniach *in vivo*, w dużym modelu zwierzęcym (owcy). Uzyskane wyniki mają w mojej ocenie charakter nowatorski, a także translacyjny.

W kolejnych badaniach, przeprowadzonych w dużym modelu przedklinicznym *in vivo*, o którym mowa powyżej, których wyniki opublikowano w pracy Stammitz i wsp. *Cells*, 2022, 11(21): 3446, Doktorantka podjęła się oceny potencjału regeneracyjnego ubytków kostnych przez komórki MSCs ze szpiku kostnego owcy w połączeniu z biozgodnym rusztowaniem opartym o złożony biomateriał bazujący o polikaprolakton (PCL/HAP/ $\beta$ -TCP) dekorowany hydroksyapatytem (n-HAP), po wszczepieniu *in vivo* w modelu owcy. W tym celu w pierwszej kolejności rusztowania oparte

o wspomniany biomateriał były zasiedlane komórkami MSCs, gdzie oceniano m.in. zdolność ich adhezji i proliferacji na tym rusztowaniu, jak również poziom ich różnicowania osteogennego w obecności pożywki różnicującej wzbogaconej (lub nie) w FGF-2 i BMP-2. Doktorantka wykazała m.in., że owcze komórki MSCs szpiku kostnego zasiedlały rusztowanie i utrzymywały aktywność proliferacyjną przez 21 dni hodowli we wszystkich stosowanych pożywkach, z których w pożywce wzbogaconej w FGF-2 i BMP-2 te procesy były szczególnie intensywne. Doktorantka potwierdziła także stymulujący efekt BMP-2 na proces osteogenezy także w komórkach MSCs zasiedlających implant, co zbadała na poziomie ekspresji genów związanych z osteogenezą, jak również cytochemicznie – identyfikując złogi wapniowe oraz aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) w różnicujących komórkach MSCs *in vitro*.

Uzyskane wyniki są spójne z obserwacjami przedstawionymi w publikacji pierwszej i wskazują m.in., że czynniki wzrostowe takie jak FGF-2 i BMP-2 mogą być wykorzystywane do modulacji potencjału osteogennego komórek MSCs w standardowych warunkach hodowlanych *in vitro*, ale także optymalizując podejścia inżynierii tkankowej – tj. w hodowli tych komórek na syntetycznych implantach przeznaczonych do regeneracji ubytków kostnych. Uzyskane wyniki mają zatem istotne znaczenie translacyjne.

W kolejnym etapie niniejszych badań, we współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Doktorantka zbadała biozgodność i potencjał regeneracyjny w/w konstruktów po jego implantacji do tkanek żuchwy owcy *in vivo*. Badania pilotażowe przeprowadzone na czterech zwierzętach wykazały m.in. immunomodulacyjny potencjał wszczepionych komórek MSCs w miejscu uszkodzenia, a przede wszystkim wykazały biozgodność przeczepionego implantu oraz jego potencjał osteogeny *in vivo*.

Ta część badań stanowi w mojej ocenie jeden z istotnych walorów pracy Doktorantki koncentrując się na badaniach o charakterze przedklinicznym, badającym możliwość przyszłego zastosowania opracowanych przez Doktorantkę rozwiązań terapeutycznych w regeneracji ubytków kostnych w praktyce klinicznej.

Współczesne możliwości praktycznych aplikacji komórek MSCs, jak również rusztowań i czynników biologicznie czynnych w naprawie ubytków kostnych, Doktorantka przedyskutowała także swojej kolejnej pracy przedstawionej do oceny (Stamnitz i Klimczak, Cells. 2021, 10(8):1925). W publikacji przeglądowej Doktorantka przedstawiła merytoryczne przesłanki do stosowania komórek MSCs w regeneracji ubytków kostnych, wynikające m.in. z ich właściwości biologicznych i potencjału różnicowania. Przedstawiła także możliwości zastosowania tych komórek w połączeniu z rusztowaniami opracowanymi dla zastosowań w inżynierii tkankowej, które wzmacniają potencjał osteogeny komórek MSCs. Podała także konkretne przykłady zastosowanych z sukcesem biomateriałów w regeneracji uszkodzeń kostnych, użytych w badaniach przedklinicznych oraz

w badaniach klinicznych u pacjentów, wskazując na przykłady zarejestrowanych już produktów leczniczych opartych o biozgodne rusztowania w naprawie tkankowej.

W mojej ocenie publikacja ta stanowi świetne kompendium dotyczące współczesnych trendów w inżynierii tkankowej i terapiach regeneracyjnych tkanki kostnej, wykorzystujących nowe biomateriały oraz komórki MSCs. Co istotne, w mojej ocenie publikacja potwierdza także translacyjne ukierunkowanie Doktorantki w jej badaniach i potwierdza jej zainteresowanie aspektami translacyjnymi badań, które prowadzi.

Odkrycia Doktorantki przedstawione w publikacjach są w mojej ocenie nowatorskie i wykazują wysoki potencjał wdrożeniowy. Mogą one stanowić podstawę do opracowania przyszłych, zoptymalizowanych strategii leczniczych w naprawie tkanki kostnej, w oparciu o komórki MSCs oraz złożone implanty.

W czasie lektury rozprawy i publikacji nasunęło mi się kilka pytań merytorycznych oraz metodycznych, na które chciałabym poprosić o odpowiedzi i wyjaśnienia w czasie obrony jej pracy:

1. W jaki sposób Doktorantka dobrała stężenia czynników wzrostowych zastosowanych w badaniach (tj. 20ng/mL FGF-2 oraz 100ng/mL BMP-2)? Czy wykonywane były wcześniej jakieś badania optymalizacyjne wskazujące na efektywność wskazanych stężeń obu czynników na komórek MSCs (w tym na badane w pracy MSCs ze szpiku kostnego owcy)?
2. W Publikacji 1 (Gromolak i wsp. *IJMS*, 2020, 21 (24):9726) na Rycinie 1, na zdjęciu w panelu e) widoczne są struktury, które Doktorantka interpretuje jako struktury przypominające komórki kostne („bone-like structures”). Mam pytanie, jak Doktorantka identyfikowała te struktury i odróżniała je np. od adipocytów? Czy wykonywała może zdjęcia hodowli w większych powiększeniach, aby odróżnić te dwa typy obiektów komórkowych, które mogą pojawiać się w hodowli różnicujących MSCs?
3. W Publikacji 1 (Gromolak i wsp. *IJMS*, 2020, 21 (24):9726) na Rycinie 3, Doktorantka przedstawiła stabilny fenotyp komórek MSCs owcy, hodowanych przez 21 dni w różnych pożywkach, w tym m.in. w obecności BMP-2. Jak Doktorantka interpretuje taką stabilność fenotypu (szczególnie w odniesieniu do wysokiej ekspresji antygenów CD73 i CD105) w komórkach, które przez dłuższy czas hodowane były w obecności czynnika wzrostowego, który jest silnym czynnikiem stymulującym osteogenezę, co pociąga zmianę fenotypową?
4. W kontekście badań przedstawionych w publikacji 2 (Stamnitz i wsp. *Cells*, 2022, 11(21): 3446) mam pytanie odnośnie wyboru zastosowanego biomateriału. Prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie jakie aspekty merytoryczne decydowały o konstrukcji tego złożonego biomateriału z konkretnych składowych chemicznych (PCL/HAP/ $\beta$ -TCP) oraz o jego wyborze do stworzenia implantu w badaniach Doktorantki? Tu też mam pytanie ogólniejsze: Jakimi ogólnie zasadami według Doktorantki powinniśmy się kierować przy konstruowaniu, czy też



wyborze biomateriałów w celu ich łączenia np. z komórkami MSCs dla aplikacji w naprawie tkankowej? Na co zwracać uwagę?

5. W kontekście publikacji 3 (Stamnitz i Klimczak, *Cells*. 2021, 10(8):1925) mam także pytania ogólniejsze: Jak Doktorantka wyobraża sobie dalszy rozwój strategii leczniczych opartych o tzw. inżynierię tkankową w naprawie ubytków kostnych? Jakiego trendu na przyszłość Doktorantka widzi w tym obszarze? Jak Doktorantka wyobraża sobie także dalsze zastosowania wyników swoich badań w medycynie (lub/i weterynarii), a także rozwój opracowanych przez nią podejść terapeutycznych?

Myślę, że odpowiedzi na postawione powyżej pytania i wątpliwości będą dobrym punktem wyjścia do dyskusji o wynikach badań Doktorantki, w czasie obrony jej pracy.

Podsumowując, praca doktorska mgr Sandry D. Stamnitz wpisuje się w ważny aspekt badań translacyjnych z zakresu medycyny regeneracyjnej, koncentrując się na wykorzystaniu komórek MSCs w regeneracji ubytków kostnych. W swoich badaniach Doktorantka wykazała m.in. możliwość modulowania i wzmacniania potencjału osteogennego tych komórek z zastosowaniem specyficznych, właściwie dobranych czynników wzrostowych (w tym BMP-2) oraz poprzez łączenie ich z właściwymi rusztowaniami, które zwiększałyby efektywność regeneracyjną tych komórek po ich aplikowaniu w miejsce ubytku kostnego *in vivo*. Otwiera to nowe możliwości w opracowywaniu nowych podejść terapeutycznych w naprawie tkanki kostnej z zastosowaniem tych komórek macierzystych. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią jej oryginalne osiągnięcie naukowe i niosą istotny wkład w rozwój nauk biomedycznych, w tym medycyny regeneracyjnej. Z względu na walor aplikacyjny oraz zastosowane modele badawcze, wyniki Doktorantki z pewnością mogą mieć w przyszłości istotne znaczenie praktyczne.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca 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.) i wnoszę o dopuszczenie mgr Sandry D. Stamnitz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie ze względu na nowatorski charakter i wysoką wartość poznawczą opublikowanych wyników badań objętych niniejszą rozprawą doktorską oraz ich wysokie walory aplikacyjne, a także ze względu na znaczącą aktywność naukową oraz znaczący dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki przedstawiony w Autoreferacie, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu IiTD PAN we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Z poważaniem,



