

Politechnika Śląska w Gliwicach
Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Rozprawa doktorska – obszerne streszczenie

Ocena *in vitro* właściwości przeciwzapalnych rhamnogalakturonanu-I do zastosowania w modyfikacji powierzchni tytanowych implantów stomatologicznych

The *in vitro* evaluation of rhamnogalacturonan-I anti-inflammatory properties for application in surface modification of titanium dental implants

mgr inż. ANNA MIESZKOWSKA

Promotor: prof. dr hab. inż. Korneliusz Miksch, Politechnika Śląska

Kopromotor: dr n. med. Katarzyna Gurzawska, University of Birmingham

Gliwice, 2018

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi spójny tematycznie cykl trzech oryginalnych artykułów.

[I] **Meresta A.**, Folkert J., Gaber T., Miksch K., Buttgerit F., Detert J., Pischon N. Gurzawska K.: Plant-derived pectin nanocoatings to prevent inflammatory cellular response of osteoblasts following *Porphyromonas gingivalis* infection. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12:433-445.

[II] **Mieszkowska A.**, Folkert J., Gaber T., Miksch K., Gurzawska K.: Pectin nanocoating reduces proinflammatory fibroblast response to bacteria. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2017, 105(12):3475-3481.

[III] **Mieszkowska A.**, Folkert J., Burke B., Addison O., Gurzawska K.: Pectin coating of titanium and polystyrene surfaces modulates the macrophage inflammatory response. *European Journal of Biological Research*, 2018, 8(2):84-95.

Do pracy doktorskiej włączono również dwa artykuły, będące uzupełnieniem przedstawionego tematu, nie stanowią one jednak bezpośredniej podstawy dysertacji.

[IV] Folkert J., **Meresta A.**, Gaber T., Miksch K., Buttgerit F., Detert J., Pischon N. Gurzawska K.: Nanocoating with plant-derived pectins activates osteoblast response in vitro. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 239-249.

[V] Folkert J., **Mieszkowska A.**, Gaber T., Miksch K., Gurzawska K.: Surface nanocoating with pectin improves fibroblast response *in vitro*. Praca w recenzji w *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.

Odwołania do wyżej wymienionych artykułów zostały w tekście niniejszego streszczenia przedstawione przy zastosowaniu rzymskiej numeracji.

Wykaz skrótów

ALPL	fosfataza alkaliczna (ang. <i>alkaline phosphatase</i>)
ANOVA	analiza wariancji (ang. <i>analysis of variance</i>)
BGLAP	osteokalcyna (ang. <i>osteocalcin</i>); białko kostne zawierające kwas gamma-karboksyglutaminowy (ang. <i>bone gamma-carboxyglutamic acid protein</i>)
BrdU	5-bromo-2'-deoksyurydyna (ang. <i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i>)
COL1	kolagen typu I (ang. <i>collagen type I</i>)
Ct	próg cyklu (ang. <i>cycle threshold</i>)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FGFR	receptor czynnika wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor receptor</i>)
FN	fibronektyna (ang. <i>fibronectin</i>)
GAL3	galektyna-3 (ang. <i>galectin-3</i>)
IL	interleukina (ang. <i>interleukin</i>)
LPS	lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharide</i>)
MMP	metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. <i>matrix metalloproteinase</i>)
RANKL	ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik κ B (ang. <i>receptor activator for nuclear factor κB ligand</i>)
real-time PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time polymerase chain reaction</i>)
RG-I	ramnogalakturonan-I (ang. <i>rhamnogalacturonan-I</i>)
RQ	względny poziom ekspresji genu (ang. <i>relative quantitation</i>)
RT	odwrotna transkrypcja (ang. <i>reverse transcription</i>)
RUNX2	czynnik transkrypcyjny Runx-2 (ang. <i>runt-related transcription factor 2</i>)
SEM	błąd standardowy średniej (ang. <i>standard error of the mean</i>)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworu α (ang. <i>tumour necrosis factor alpha</i>)
WST-1	rozpuszczalna w wodzie sól tetrazolowa (ang. <i>water soluble tetrazolium salt</i>)

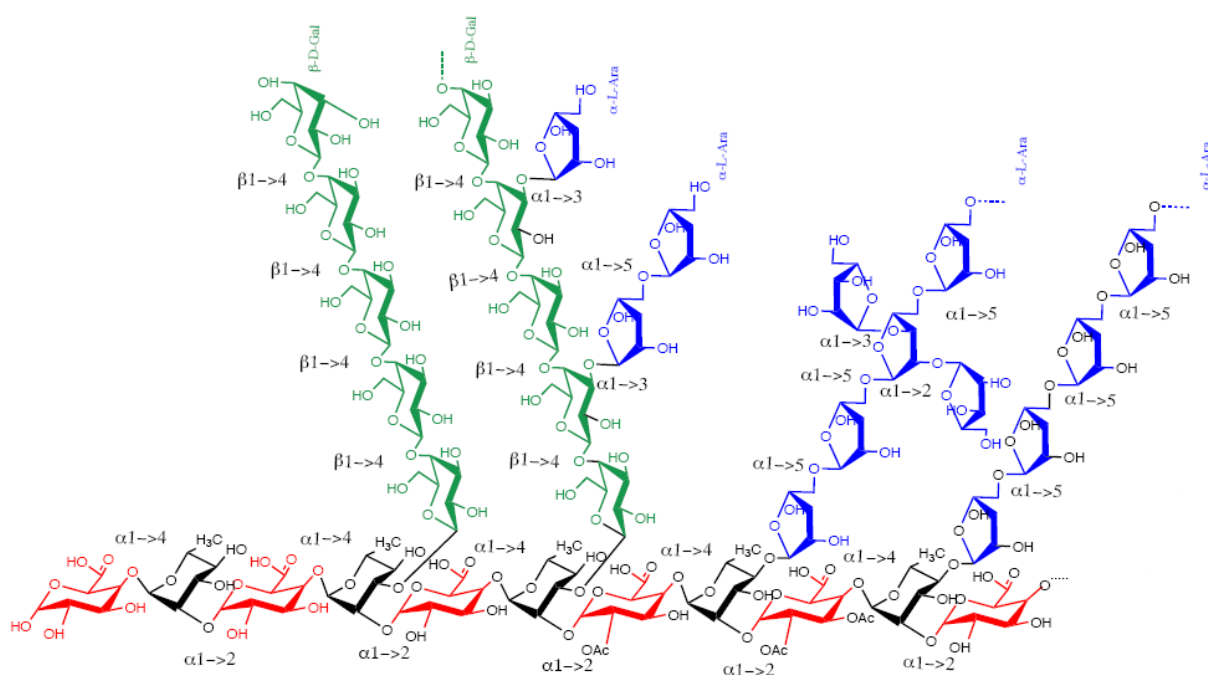
1. Wprowadzenie

Implantologia to dynamicznie rozwijająca się interdyscyplinarna dziedzina stomatologii, która pozwala na funkcjonalną, trwałą i estetyczną odbudowę braków zębowych (Koszuta i in., 2012). Podstawę rozwoju współczesnej implantologii stanowi inżynieria biomateriałów. Obecnie tytan oraz jego stopy stanowią podstawowy materiał budulcowy uzupełnień implantoprotetycznych, takich jak śródkostne wszczepy stomatologiczne. Tytanowe wszczepy śródkostne pozwalają uzyskać trwałe i funkcjonalne połączenie implantu z tkanką kostną w procesie osteointegracji. Pomimo że tytanowe wszczepy śródkostne z powodzeniem stosowane są w leczeniu implantologicznym, wciąż istnieje ryzyko wystąpienia powikłań po zabiegu implantacji, które w konsekwencji mogą prowadzić do utraty implantu.

Głównym czynnikiem, zakłócającym proces osteointegracji jest kolonizacja powierzchni wszczepu przez bakterie, co zapoczątkowuje proces formowania biofilmu bakteryjnego i rozwój zakażenia tkanek wokół implantu, zwanego zakażeniem okołowszczepowym. W zakażeniach związanych z implantami stomatologicznymi dominują periopatogeny odpowiedzialne za przewlekłe zapalenia przyzębia. Głównym periopatogenem identyfikowanym w dojrzałym biofilmie utworzonym na powierzchni tytanowego wszczepu jest bakteria *Porphyromonas gingivalis* (Pokrowiecki i in., 2014a; Pokrowiecki i in., 2014b). Wytwarzane przez bakterie toksyny oraz szkodliwe produkty przemiany materii indukują odpowiedź zapalną organizmu. Proces zapalny obejmuje tkanki otaczające implant, prowadząc w konsekwencji do miejscowej resorpcji kości i destabilizacji wszczepu (Belibasakis, 2014; Belibasakis i in., 2015; Pokrowiecki i in., 2014b).

W celu zminimalizowania zapaleń okołowszczepowych, współczesne kierunki badań biomateriałów skupiają się na odpowiedniej modyfikacji warstwy wierzchniej wszczepów (Pokrowiecki i in., 2014a). Zastosowanie bioaktywnych związków organicznych, wykazujących właściwości przeciwzapalne do pokrywania powierzchni implantów zwiększa prawdopodobieństwo sukcesu leczenia implantologicznego. Doniesienia literaturowe wskazują na potencjalną możliwość zastosowania pektyn – roślinnych polisacharydów do modyfikacji wierzchniej warstwy wszczepów. Właściwości przeciwzapalne zostały potwierdzone dla frakcji pektyn zwanej ramnogalakturonanem-I (RG-I).

RG-I jest rozgałęzionym polisacharydem, który stanowi od 20 do 35% ogółu pektyn zawartych w tkankach roślinnych. Budowę cząsteczki RG-I przedstawiono na rysunku 1.1.



Rys. 1.1. Schemat ilustrujący strukturę chemiczną RG-I

Szkielet RG-I zbudowany jest z naprzemiennie powtarzających się dimerów reszt kwasu α -D-galakturonowego i L-ramnozy. Miejscem wiązania łańcuchów bocznych w cząsteczce RG-I są głównie reszty ramnozy. Łańcuchy boczne mogą być liniowe lub rozgałęzione i zbudowane są z reszt D-galaktozy i L-arabinozy. (Caffall i Mohnen, 2009; Pińkowska i Złocińska, 2014). Strukturę cząsteczki RG-I można modyfikować przy użyciu różnorodnych, komercyjnie dostępnych enzymów, co pozwala odpowiednio zmieniać jej właściwości biologiczne, fizyczne oraz chemiczne. Enzymatycznym modyfikacjom zwykle poddaje się boczne łańcuchy cząsteczki RG-I. Polegają one na wycięciu reszt arabinozy i/lub galaktozy z bocznych odgałęzień przy użyciu określonych enzymów (Gurzawska i in., 2012a; Kokkonen i in., 2008; Morra i in., 2004; Munarin i in., 2011).

Możliwość modyfikacji struktury chemicznej, brak toksyczności oraz relatywnie prosta i tania procedura izolacji z materiału roślinnego sprawiają, że RG-I jest obiecującym biomateriałem implantologicznym. W niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę oceny właściwości przeciwzapalnych RG-I w aspekcie możliwości jego zastosowania do modyfikacji wierzchniej warstwy tytanowych implantów stomatologicznych. W tym celu przeprowadzono szereg badań *in vitro* z użyciem hodowli komórkowych – układów modelowych pozwalających na symulację warunków panujących *in vivo*.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu ramnogalakturonanu-I, potencjalnego materiału do pokrywania powierzchni implantów śródkostnych, na komórki uczestniczące w inicjacji i regulacji procesu zapalnego oraz zaangażowane w odbudowę tkanki kostnej w warunkach *in vitro*. Ocenie poddano reakcje komórek, które zastymulowano bakteryjnym czynnikiem infekcyjnym, na powierzchnie polistyrenowe [artykuły I-III] oraz tytanowe [artykuł III], pokryte niemodyfikowanym oraz enzymatycznie modyfikowanym RG-I (z krótszymi bocznymi łańcuchami zawierającymi arabinozę). Nadrzędny cel pracy został zrealizowany poprzez następujące cele szczegółowe:

- określenie wpływu niemodyfikowanego i modyfikowanego RG-I na proliferację i aktywność metaboliczną zainfekowanych osteoblastów, proces mineralizacji macierzy kostnej, a także poziom ekspresji genów związanych z osteogenezą oraz inicjacją procesu zapalnego [artykuł I].
- ocenę wpływu niemodyfikowanego i modyfikowanego RG-I na proliferację i aktywność metaboliczną zainfekowanych fibroblastów, a także ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej oraz inicjację stanu zapalnego [artykuł II].
- zbadanie wpływu niemodyfikowanego i modyfikowanego RG-I na poziom ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne i przeciwzapalne w zaktywowanych makrofagach [artykuł III].

3. Modyfikacja powierzchni polistyrenowych i tytanowych z użyciem RG-I

Materiał do badań stanowił ramnogalakturonan-I (RG-I), który wyizolowano z ziemniaka. Przeprowadzenie enzymatycznej modyfikacji RG-I, polegającej na wycięciu arabinozy z łańcuchów bocznych struktury RG-I, pozwoliło uzyskać RG-I modyfikowany.

Niemodyfikowany i modyfikowany RG-I zastosowano do pokrycia polistyrenowych powierzchni płytek przeznaczonych do hodowli komórkowych [artykuły I-III] oraz powierzchni dysków tytanowych [artykuł III], które następnie zostały wykorzystane w badaniach *in vitro*. Do pokrycia badanych powierzchni cząsteczkami RG-I zastosowano zjawisko adsorpcji fizycznej. Detekcja pektyn na powierzchniach polistyrenowych została przeprowadzona przed przystąpieniem do badań *in vitro* oraz po ich zakończeniu przy użyciu testu immunoenzymatycznego (ELISA) z wykorzystaniem przeciwciała wykazującego

powinowactwo do galaktozy w cząsteczce RG-I. Z kolei na powierzchniach tytanowych, RG-I zwizualizowano przy użyciu znakowania immunofluorescencyjnego oraz mikroskopii konfokalnej.

4. Badania *in vitro* właściwości przeciwzapalnych RG-I

W celu określenia właściwości przeciwzapalnych niemodyfikowanego oraz modyfikowanego RG-I, przeprowadzono badania z wykorzystaniem hodowli *in vitro* komórek, które zainfekowano bakteriami gatunku *P. gingivalis* [artykuły I-III] oraz zastymulowano lipopolisacharydem (LPS), pochodzącym z bakterii gatunku *E. coli* [artykuł III]. Stymulacja komórek bakteryjnym czynnikiem infekcyjnym została przeprowadzona w celu wzbudzenia odpowiedzi prozapalnej. Zaktywowane komórki hodowano na powierzchniach pokrytych modyfikowanym i niemodyfikowanym RG-I oraz kontrolnych. W badaniach *in vitro* wykorzystano hodowle pierwotnych mysich osteoblastów, mysich osteoblastów linii MC3T3-E1, pierwotnych ludzkich fibroblastów oraz pierwotnych ludzkich makrofagów. Wymienione typy komórek zostały wybrane ze względu na ich kluczową rolę w procesie tworzenia tkanki kostnej (osteogenezy), jak również w inicjacji i regulacji odczynu zapalnego. Pierwotne osteoblasty pozyskano z kości czaszki myszy, pierwotne fibroblasty z ludzkiego dziąsła, natomiast pierwotne makrofagi z ludzkiej krwi obwodowej. Schemat, ilustrujący kolejne etapy badań *in vitro*, przedstawiono na rysunku 4.1. W określonych punktach czasowych w zainfekowanych hodowlach osteoblastów przeprowadzono analizę:

- proliferacji z wykorzystaniem testu inkorporacji 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU)
- aktywności metabolicznej przy użyciu testu redukcji soli tetrazolowych (WST-1)
- poziomu mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) metodą barwienia depozytów wapniowych czerwienią alizarynową
- ekspresji genów związanych z osteogenezą, resorpcją kości oraz procesem zapalnym. Metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) określono wpływ badanych materiałów na ekspresję genów kodujących: (i) markery dojrzwania i różnicowania osteoblastów (*Runx2*, *Colla1*, *Alpl*, *Bglap*), (ii) czynnik resorpcji kości (*Rankl*) oraz (iii) cytokiny prozapalne (*Tnfa*, *Il1b*, *Il6*). Analizy real-time PCR poprzedzono izolacją całkowitego RNA z hodowli oraz reakcją odwrotnej transkrypcji (RT). Względny poziom ekspresji badanych genów (RQ) wyznaczono metodą porównawczą $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak i Schmittgen, 2001).



Rys. 4.1. Schemat ilustrujący przebieg badań *in vitro*

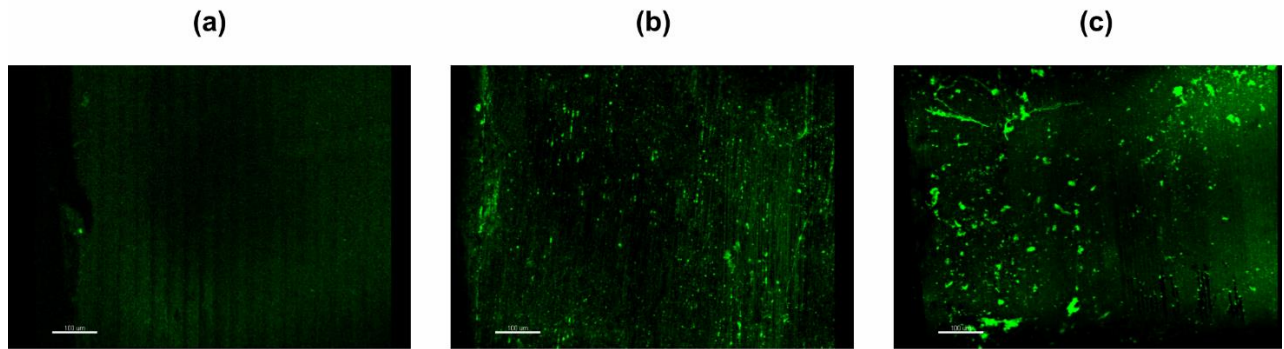
Celem dokonania oceny *in vitro* odpowiedzi zainfekowanych fibroblastów na powierzchnie polistyrenowe pokryte RG-I wykonane zostały oznaczenia proliferacji, aktywności metabolicznej oraz poziomu ekspresji wybranych genów związanych z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej (*COL1A1*, *FNI*, *FGFR1*, *MMP2*) i procesem zapalnym (*IL1B*, *IL8*, *TNFA*).

Odpowiedź zapalną zaktywowanych makrofagów określono na powierzchniach tytanowych oraz polistyrenowych, pokrytych RG-I na podstawie wyników przeprowadzonych analiz ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne (*TNFA*, *IL1B*, *IL8*) i przeciwzapalne (*IL10*).

Wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* zostały przedstawione w postaci średnich arytmetycznych wraz z błędem standardowym średniej (SEM). Analiza statystyczna uzyskanych wyników została wykonana w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test Bonferroniego. Za poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.

5. Ocena *in vitro* właściwości przeciwzapalnych RG-I

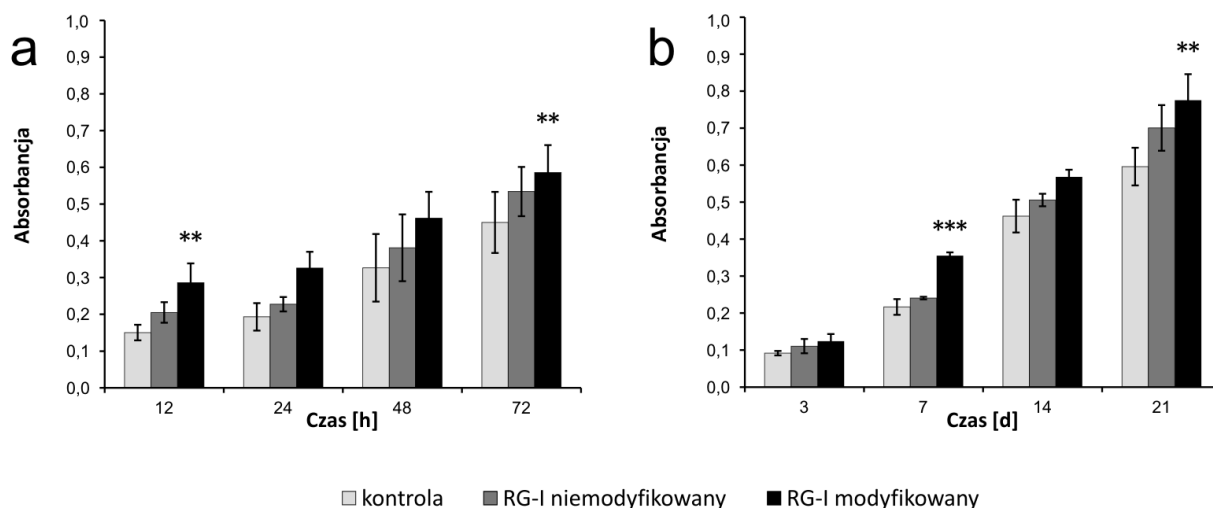
Aktywność przeciwzapalną badanych frakcji RG-I określono w oparciu o układy modelowe *in vitro* – hodowle osteoblastów, fibroblastów oraz makrofagów, które zastymulowano bakteryjnym czynnikiem infekcyjnym w celu wzbudzenia reakcji zapalnej. Na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* zaobserwowano, że spośród analizowanych pektyn najsilniejszy efekt przeciwzapalny wykazuje enzymatycznie modyfikowany RG-I. Bioaktywne właściwości tej pektyny bezpośrednio wynikają z jej budowy chemicznej. Struktura chemiczna modyfikowanego RG-I charakteryzuje się występowaniem krótszych łańcuchów bocznych arabinozy i wyższą zawartością procentową galaktozy (ok. 75%) w odniesieniu do niemodyfikowanego RG-I (ok. 60%). Obecność w cząsteczce RG-I silnie rozgałęzionych łańcuchów bocznych, zbudowanych z arabinozy, wpływa hamująco na przebieg procesów komórkowych (Bussy i in., 2008; Kokkonen i in., 2008; Nagel i in., 2008). Ponadto rozbudowane odgałęzienia boczne arabinozy ograniczają komórkom dostęp do występującej w cząsteczce RG-I galaktozy – potencjalnego inhibitora procesu zapalnego. Udowodniono w badaniach o charakterze eksperymentalnym, że galaktoza pełni funkcję liganda galektyny-3 (GAL3) – białka, które inicjuje proces zapalny. Przeprowadzona detekcja badanych pektyn na powierzchni tytanowej przy użyciu techniki mikroskopii konfokalnej potwierdziła wyższą zawartość galaktozy na powierzchni pokrytej modyfikowanym RG-I (rysunek 5.1).



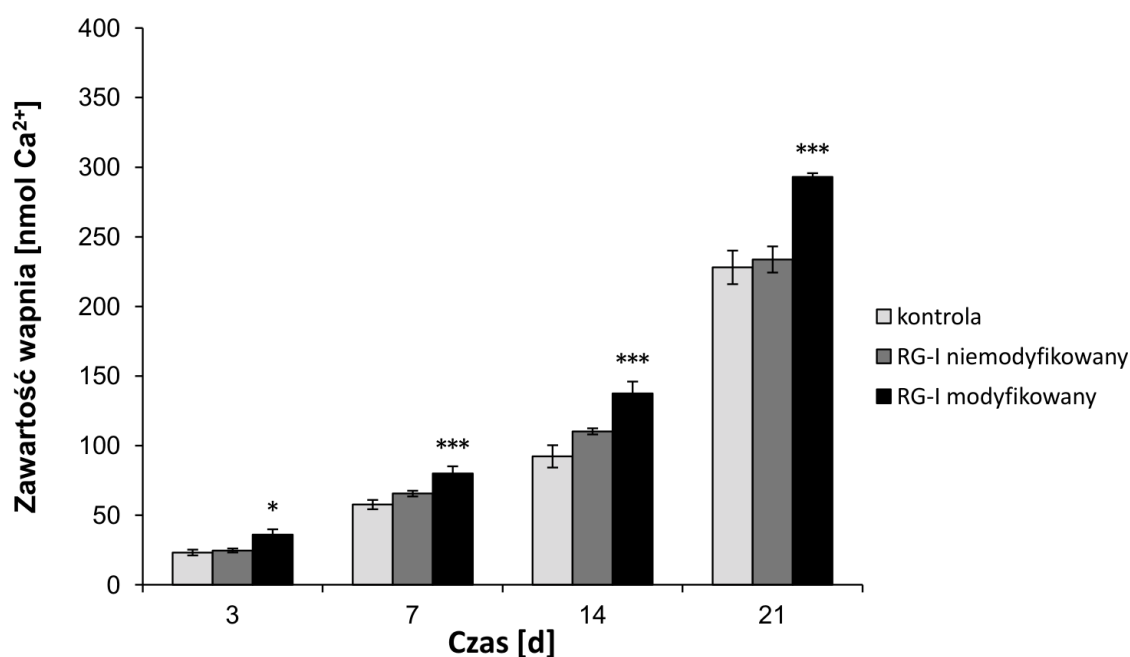
Rys. 5.1. Obrazowanie galaktozy na powierzchni tytanowej: kontrolnej (a), pokrytej niemodyfikowanym RG-I (b) oraz modyfikowanym RG-I (c) w konfokalnej mikroskopii. Do wyznakowania galaktozy zastosowano przeciwciało sprzężone z fluorochromem FITC (zielony).

5.1. Model mysich osteoblastów

W artykule I podjęto próbę oceny właściwości przeciwzapalnych niemodyfikowanego oraz modyfikowanego RG-I w odniesieniu do osteoblastów zainfekowanych bakteriami *Porphyromonas gingivalis*. Osteoblasty jako komórki kościotwórcze pełnią kluczową rolę w procesie osteointegracji. W wyniku zapalenia tkanek okołowszczepowych, indukowanego przez periopatogeny, osteoblasty wykazują obniżoną aktywność proliferacyjną oraz metaboliczną, co w konsekwencji może prowadzić do zahamowania osteogenezy. Na podstawie przeprowadzonych badań własnych stwierdzono, że osteoblasty stymulowane bakteriami *P. gingivalis* wykazują większą zdolność do proliferacji oraz wyższą aktywność metaboliczną na powierzchniach polistyrenowych, pokrytych cząsteczkami modyfikowanego RG-I w porównaniu do zainfekowanych komórek kościotwórczych, hodowanych na materiale kontrolnym (**rysunek 5.1.1**). Znamienne różnice w aktywności proliferacyjnej zainfekowanych osteoblastów pierwotnych zaobserwowano na powierzchniach modyfikowanych RG-I z krótszymi bocznymi łańcuchami arabinozy w 12 oraz 72 godzinie hodowli. Z kolei poziom aktywności metabolicznej był istotnie wyższy w stosunku do kontroli na powierzchni pokrytej modyfikowanym RG-I w 7 oraz 21 dniu zainfekowanej hodowli osteoblastów pierwotnych. Z uwagi na to, że rozwój zapalenia okołowszczepowego prowadzi do zmniejszenia gęstości mineralnej kości w wyniku zahamowania procesu mineralizacji (kalcyfikacji), jak również uwolnienia jonów wapnia ze struktur kostnych szczegółowym badaniom *in vitro* poddano proces mineralizacji macierzy kostnej. Wykazano, że hodowle zainfekowanych osteoblastów, prowadzone w obecności modyfikowanego RG-I, charakteryzują się wyższą zawartością jonów wapnia w porównaniu do kontroli (**rysunek 5.1.2**).

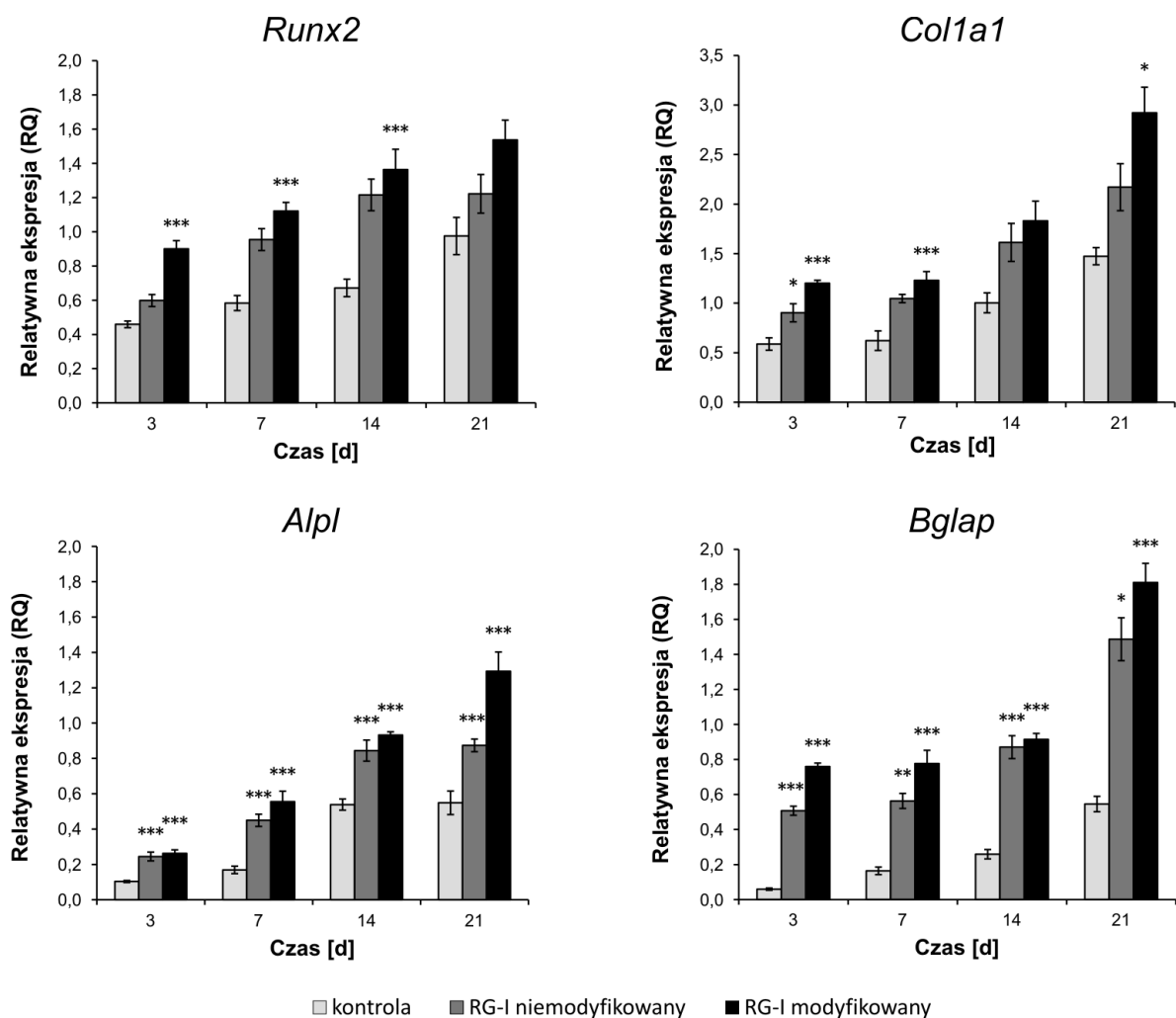


Rys. 5.1.1. Aktywność proliferacyjna pierwotnych mysich osteoblastów w 12, 24, 48 oraz 72 godzinie od infekcji (a) oraz metaboliczna w 3, 7, 14 oraz 21 dniu od infekcji (b). Uzyskane wyniki przedstawiono jako zmierzone wartości absorbancji przy długości fal 450 nm i 650 nm (pomiar referencyjny). Wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń \pm błąd standardowy (SEM). Różnice uznano jako statystycznie istotne przy $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą [$*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$] w analizie ANOVA.



Rys. 5.1.2. Zawartość jonów wapnia oznaczona w hodowli pierwotnych mysich osteoblastów w 3, 7, 14 i 21 dniu od infekcji. Uzyskany wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń \pm błąd standardowy (SEM). Różnice uznano jako statystycznie istotne przy $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą [$*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$] w analizie ANOVA.

Występowanie istotnych statystycznie różnic w zawartości depozytów wapniowych odnotowano we wszystkich analizowanych punktach czasowych (3, 7, 14 i 21 dzień). Także w obecności niemodyfikowanego RG-I stwierdzono wzrost kalcyfikacji ECM, natomiast bez znamienności statystycznej. Otrzymane wyniki pomiarów zawartości depozytów wapniowych w hodowlach *in vitro* potwierdziły wyniki przeprowadzonych analiz ekspresji genów kodujących markery dojrzewania i różnicowania osteoblastów. Przeprowadzone badania molekularne wykazały stymulujący wpływ badanych frakcji RG-I na ekspresję genów *Runx2*, *Col1a1*, *Alpl* i *Bglap* (rysunek 5.1.3).

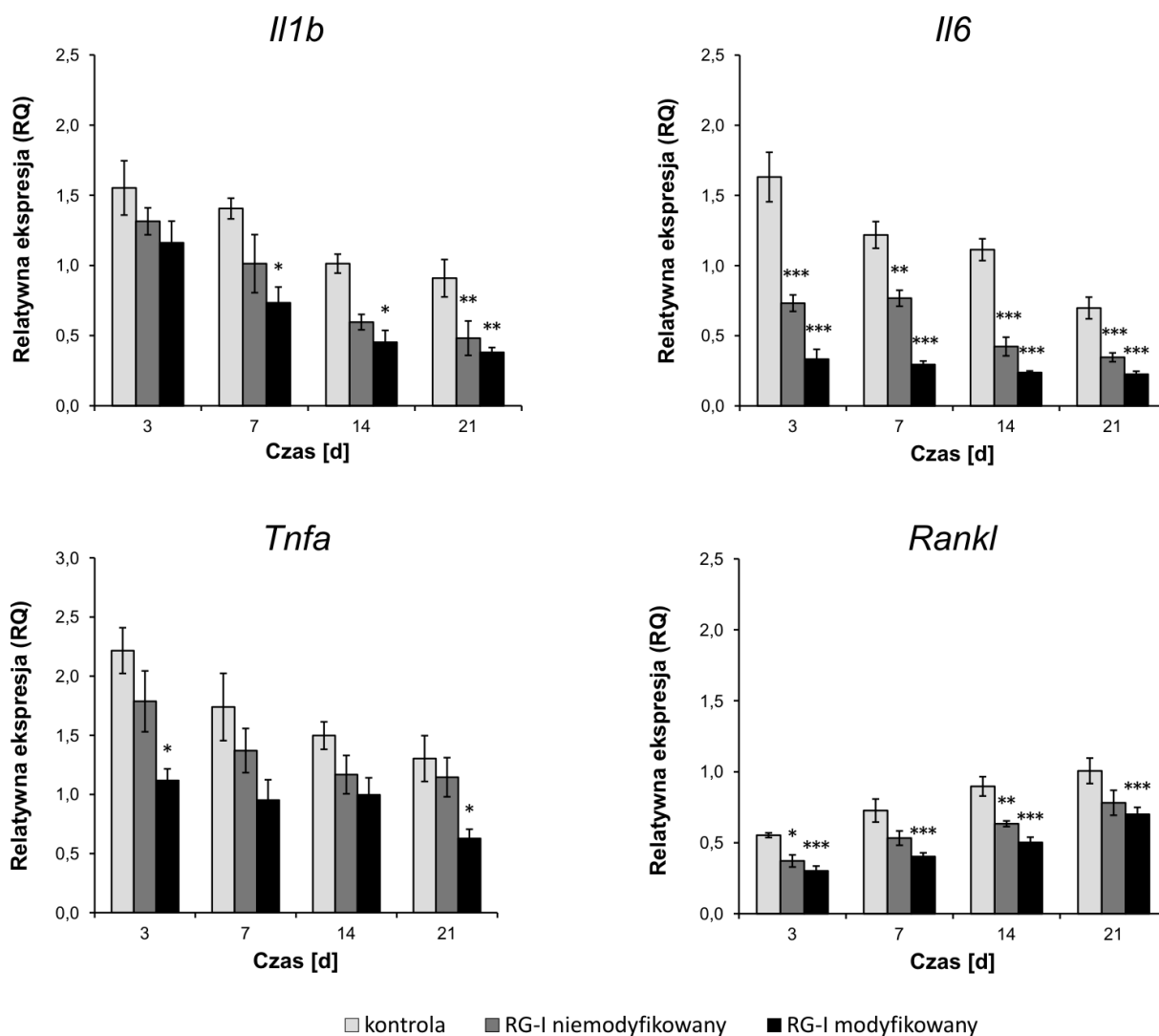


Rys. 5.1.3. Relatywny (względny) poziom ekspresji genów *Runx2*, *Col1a1*, *Alpl* i *Bglap* oznaczony w mysich osteoblastach pierwotnych w 3, 7, 14 i 21 dniu od infekcji. Wyniki normalizowano względem genu referencyjnego, kodującego β -aktynę (*Actb*). Uzyskany wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń \pm błąd standardowy (SEM). Różnice uznano jako statystycznie istotne przy $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą [$*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$] w analizie ANOVA.

Większość przedstawionych wyników była znamienne statystycznie. Odnotowany wzrost ekspresji genu *Runx2* wydaje się być szczególnie istotny ze względu na pełnione przez niego funkcje w komórce: kontrolę proliferacji, wzrostu i różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w dojrzałe komórki kościotwórcze, a także regulację ekspresji genów, które kodują białka macierzy kostnej, takie jak kolagen typu I, osteopontynę, osteokalcynę, sialoproteinę kostną. W korelacji z wynikami analizy ilościowej depozytów wapniowych, podwyższona wartość poziomu ekspresji genów *Coll1a1*, *Alpl* i *Bglap* wskazuje, że modyfikacja powierzchni cząsteczkami RG-I umożliwia stymulację procesów tworzenia, dojrzewania i mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej w przebiegu reakcji zapalnej.

Infekcja bakteriami *P. gingivalis* stymuluje osteoblasty do wzmożonej syntezy i sekrecji cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6 oraz TNF- α . Prowadzi to do redukcji kościotworzenia i nasilenia procesów resorpcyjnych. Na podstawie przeprowadzonych badań ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne stwierdzono, że zainfekowane osteoblasty, w kontakcie z badanymi pektynami, zareagowały obniżoną ekspresją genów *Il1b*, *Il6* oraz *Tnfa* w stosunku do kontroli (**rysunek 5.1.4**). Można zatem wnioskować, że oddziaływanie tych pektyn przejawia się ich regulacyjnym wpływem na ekspresję genów kodujących cytokiny o działaniu prozapalnym. Uregulowanie poziomu ekspresji cytokin IL-1 β , IL-6 oraz TNF- α zapewnia prawidłową przebudowę kości i zapobiega nadmiernej resorpcji. Ponadto w zainfekowanych osteoblastach, hodowanych na powierzchniach modyfikowanych pektynami, stwierdzono znaczące wyciszenie ekspresji genu *Rankl*, który aktywuje osteoklastogenezę – proces dojrzewania i różnicowania osteoklastów. Zwiększona liczba i aktywność osteoklastów, które pełnią funkcję komórek kościogubnych, prowadzi do destrukcji tkanki kostnej.

Reasumując, na podstawie uzyskanych wyników pomiarów proliferacji, aktywności metabolicznej i ekspresji genów związanych z tworzeniem kości oraz procesem zapalnym można przypuszczać, że niemodyfikowany oraz modyfikowany RG-I może w znacznym stopniu hamować w osteoblastach odpowiedź prozapalną, indukowaną czynnikiem infekcyjnym, a tym samym stymulować osteogenezę. Przy tym badane pektyny obniżają zdolność zainfekowanych osteoblastów do ekspresji genu kodującego białko RANKL, którego wzmożona synteza w przebiegu procesu zapalnego prowadzi do postępującej, często nieodwracalnej degradacji kości.



Rys. 5.1.4. Relatywny (względny) poziom ekspresji genów *Il1b*, *Il6*, *Tnfa* oraz *Rankl* oznaczony w mysich osteoblastach pierwotnych w 3, 7, 14 i 21 dni od infekcji. Wyniki normalizowano względem genu referencyjnego, kodującego β -aktynę (*Actb*). Uzyskany wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń \pm błąd standardowy (SEM). Różnice uznano jako statystycznie istotne przy $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą [$*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$] w analizie ANOVA.

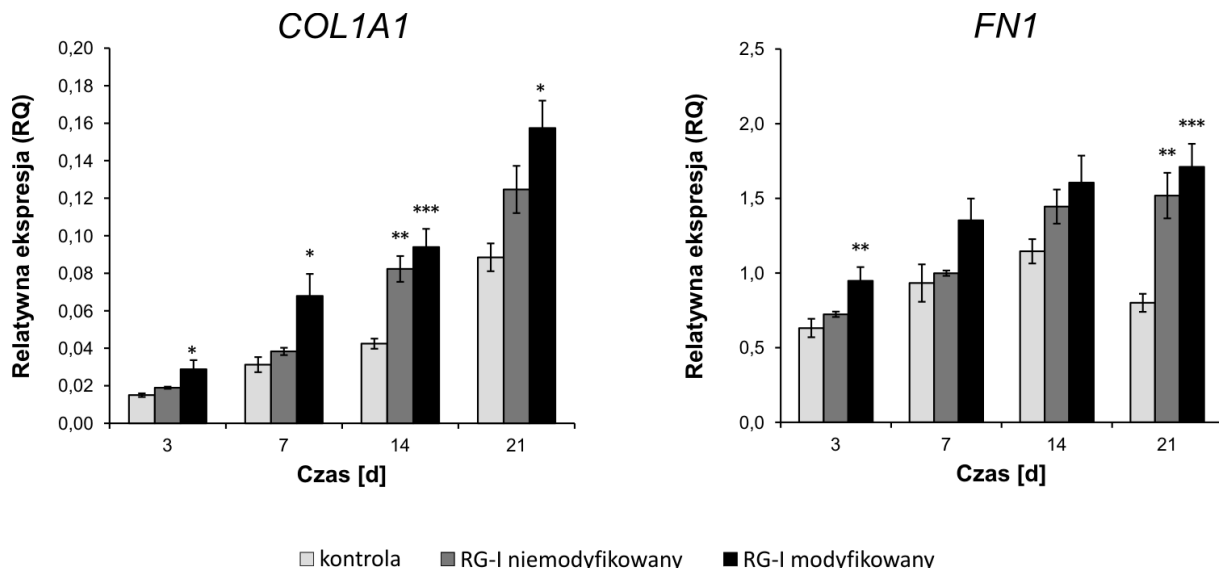
5.2. Model pierwotnych ludzkich fibroblastów

Kontynuację badań nad działaniem przeciwzapalnym niemodyfikowanego oraz modyfikowanego RG-I podjęto w artykule II. Do oceny właściwości przeciwzapalnych posłużono się modelem pierwotnych fibroblastów wyizolowanych z ludzkiego dziąsła, które zainfekowano bakteriami *P. gingivalis*. Komórki te pełnią niezwykle ważną funkcję w procesie odbudowy tkanki kostnej oraz osteointegracji ze względu na dużą aktywność metaboliczną i wydzielniczą. Produkują składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak kolagen i fibronektyna. Co więcej, w wyniku działania bakteryjnych czynników wirulencji, fibroblasty wydzielają do otaczającej przestrzeni zewnątrzkomórkowej cytokiny prozapalne oraz enzymy

proteolityczne, które wykazują działanie destrukcyjne względem tkanek znajdujących się w bliskim sąsiedztwie.

Wykonane oznaczenia aktywności proliferacyjnej w kulturach zainfekowanych fibroblastów pokazały, że w kontakcie z badanymi pektynami dochodzi do wzrostu intensywności podziałów komórkowych. Stymulujący wpływ pektyn na intensywność namnażania się fibroblastów może korzystnie oddziaływać na proces odbudowy tkanki kostnej w przebiegu reakcji zapalnej. Należy jednak zaznaczyć, że nadmierna aktywność proliferacyjna fibroblastów jest zjawiskiem niekorzystnym, ponieważ może prowadzić do powstania zwłóknień i nieprawidłowego gojenia tkanki kostnej. Z przeprowadzonych badań wynika również, że niemodyfikowany oraz modyfikowany RG-I zwiększają aktywność metaboliczną fibroblastów, które poddano infekcji bakteriami *P. gingivalis*. Wykazanie, że badane pektyny pozwalają na intensyfikację aktywności metabolicznej fibroblastów jest niezwykle istotne ze względu na fakt, że szybkość przebiegu procesów metabolicznych determinuje syntezę składników ECM.

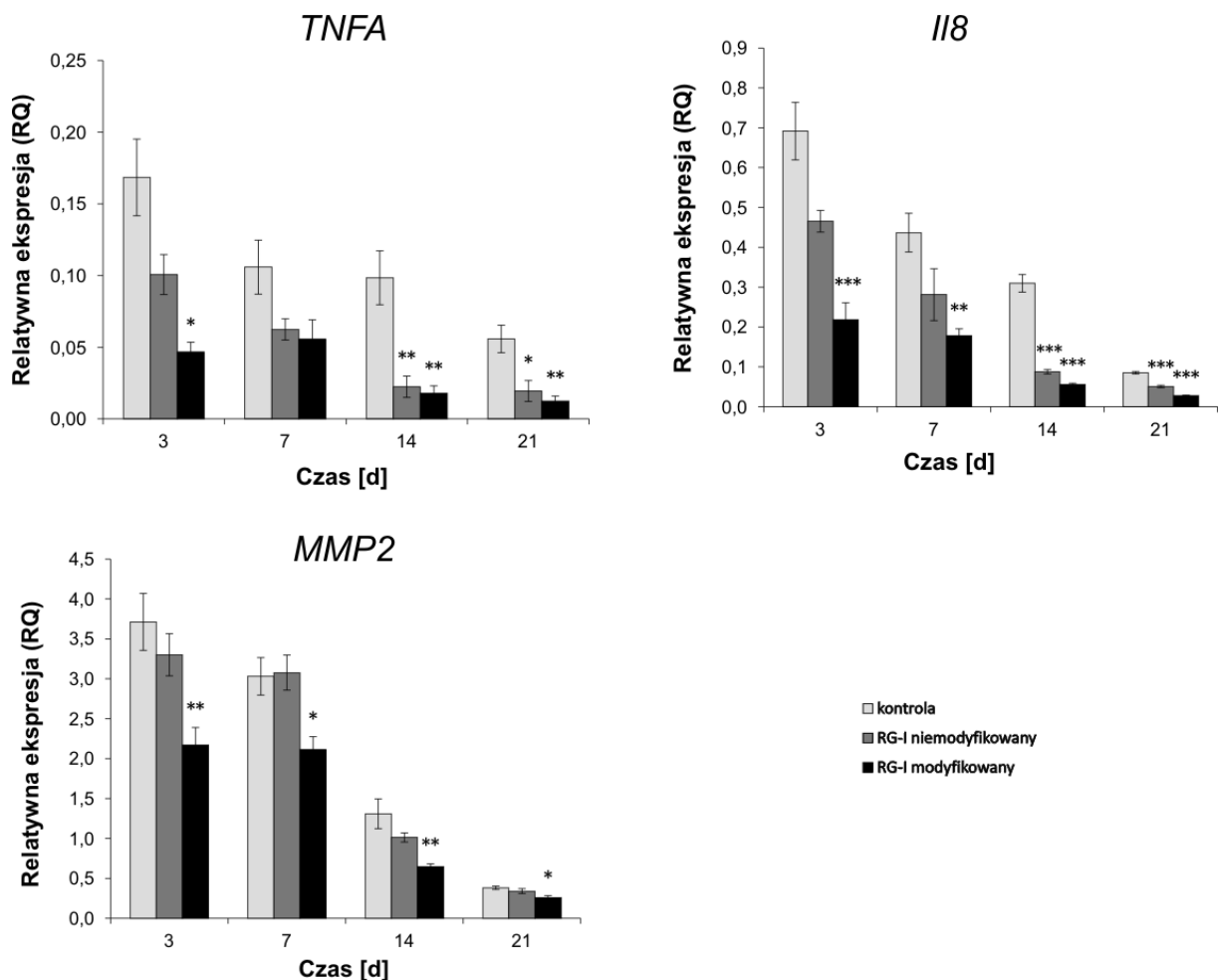
W wyniku aktywności metabolicznej i wydzielniczej fibroblastów powstaje macierz zewnątrzkomórkowa, co sprzyja procesowi gojenia tkanki kostnej. W związku z powyższym, kolejnym krokiem badań było oznaczenie w zainfekowanych fibroblastach poziomu ekspresji genów kodujących podstawowe składniki macierzy zewnątrzkomórkowej – kolagen (*COL1A1*) oraz fibronektynę (*FNI*).



Rys. 5.2.1. Relatywny (względny) poziom ekspresji genów *COL1A1*, *FN1* oznaczony w pierwotnych ludzkich fibroblastach w 3, 7, 14 i 21 dniu od infekcji. Wyniki normalizowano względem genu referencyjnego, kodującego β -aktynę (*ACTB*). Uzyskany wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń \pm błąd standardowy (SEM). Różnice uznano jako statystycznie istotne przy $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą [$*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$] w analizie ANOVA

W odpowiedzi na niemodyfikowany oraz modyfikowany RG-I zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji tych genów (**rysunek 5.2.1**). W macierzy zewnątrzkomórkowej kolagen oraz fibronektyna pełnią nie tylko funkcję strukturalną, ale również regulującą oddziaływania komórka-macierz. Ich interakcje z receptorami błonowymi regulują procesy adhezji, migracji, wzrostu i różnicowania komórek, w tym komórek kościotwórczych – osteoblastów. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że badane pektyny mogą promować proces formowania ECM i odbudowę tkanki kostnej.

Przeprowadzone badania molekularne wykazały również, że niemodyfikowany i modyfikowany RG-I obniżają poziom ekspresji genów *TNFA* oraz *IL8*, kodujących cytokiny prozapalne (**rysunek 5.2.2**).



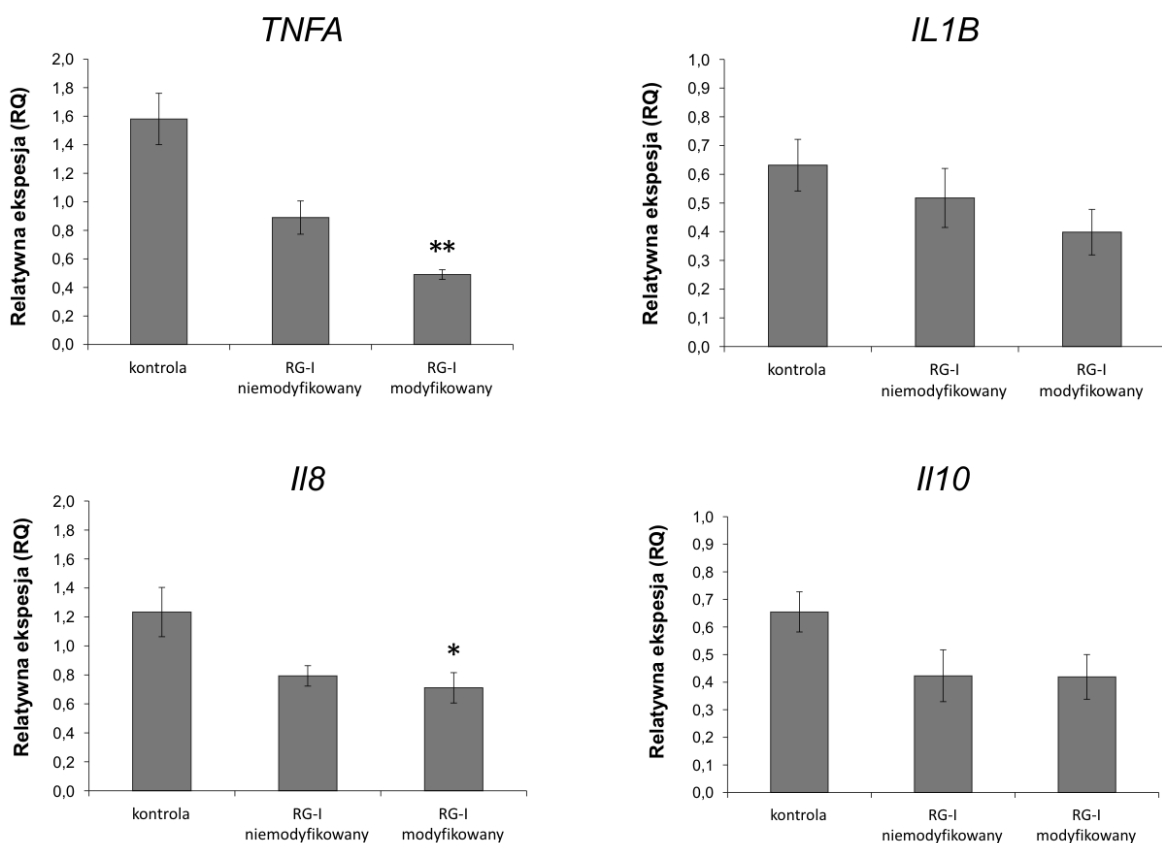
Rys. 5.2.2. Relatywny (względny) poziom ekspresji genów *TNFA*, *IL8* oraz *MMP2* oznaczony w pierwotnych ludzkich fibroblastach w 3, 7, 14 i 21 dniu od infekcji. Wyniki normalizowano względem genu referencyjnego, kodującego β -aktynę (*ACTB*). Uzyskany wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń \pm błąd standardowy (SEM). Różnice uznano jako statystycznie istotne przy $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą [$*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$] w analizie ANOVA.

Zaobserwowane zjawisko należy uznać za korzystne, ponieważ jest oznaką wyciszenia odpowiedzi zapalnej. Warto dodać, że podwyższony poziom cytokin prozapalnych prowadzi do intensyfikacji procesu osteoklastogenezy – aktywacji komórek kościogubnych. Ponadto sekrecja cytokin prozapalnych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej aktywuje w komórkach sąsiadujących tkanek nadmierne wytwarzanie enzymów proteolitycznych, głównie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP), które degradują białka ECM. Wykonane analizy molekularne pozwoliły stwierdzić, że w obecności RG-I, w badanych komórkach zachodzi niższa ekspresja genu *MMP2* w odniesieniu do kontroli. Jednakże występowanie znaczących różnic w poziomie ekspresji stwierdzono tylko w przypadku powierzchni pokrytej modyfikowanym RG-I (**rysunek 5.2.2**). Na uwagę zasługuje fakt, że niższy poziom ekspresji genu *MMP2* w zainfekowanych fibroblastach ma najprawdopodobniej związek z wyciszeniem w tych komórkach ekspresji genów, które kodują cytokiny prozapalne TNF- α oraz IL-8. Cytokiny prozapalne pełnią bowiem funkcję mediatorów syntezy MMP. Podsumowując powyższe badania molekularne można stwierdzić, że niemodyfikowany oraz modyfikowany RG-I wykazuje działanie hamujące ekspresję genów odpowiedzialnych za inicjację stanu zapalnego oraz destrukcję tkanki kostnej, przy jednoczesnej stymulacji ekspresji genów związanych z syntezą macierzy zewnątrzkomórkowej.

5.3. Model pierwotnych ludzkich makrofagów

Antyzapalną rolę pektyn potwierdziły badania przeprowadzone w oparciu o model pierwotnych ludzkich makrofagów, które przedstawione zostały w artykule III. Makrofagi zaangażowane są w odpowiedź immunologiczną organizmu. Ponadto ich fizjologiczna aktywność związana jest z modulacją wielu procesów biologicznych, determinujących wzrost i przebudowę tkanki kostnej. W procesach patologicznych, którym towarzyszy odczyn zapalny, dochodzi do silnej aktywacji makrofagów i nadmiernej produkcji cytokin prozapalnych. Głównymi stymulatorami makrofagów są czynniki zjadliwości patogenów, takie jak lipopolisacharyd (LPS). W celu zbadania działania przeciwzapalnego niemodyfikowanego i modyfikowanego RG-I, makrofagi zaktywowano w dwojaki sposób: poprzez infekcję bakteriami *P. gingivalis* oraz stymulację LPS pochodzącym z bakterii *E. coli*. Odpowiedź zapalną komórek określono na powierzchniach tytanowych oraz polistyrenowych, pokrytych badanymi pektynami. Przeprowadzone badania własne potwierdziły zdolność modyfikowanego RG-I do redukcji odpowiedzi prozapalnej makrofagów na powierzchniach tytanowych oraz polistyrenowych niezależnie od rodzaju zastosowanego czynnika infekcyjnego (*P. gingivalis*/LPS *E. coli*). Ze względu na zbieżność uzyskanych wyników badań,

w niniejszym streszczeniu przedstawiono wpływ modyfikacji powierzchni tytanowych z użyciem RG-I na makrofagi aktywowane bakteriami *P. gingivalis*. Uzyskane wyniki analiz molekularnych przedstawiono na **rysunku 5.3.1**. W obecności enzymatycznie modyfikowanego RG-I stwierdzono znaczące wyciszenie ekspresji genów *TNFA* oraz *IL8*. Należy zwrócić również uwagę na fakt, że intensywne produkcja cytokin prozapalnych w zaktywowanych makrofach prowadzi do silnej stymulacji dojrzewania i różnicowania osteoklastów - komórek zdolnych do resorpcji kości. Można zatem wnioskować, że obniżenie w obecności modyfikowanego RG-I poziomu ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne pozwoli ograniczyć destrukcyjne działanie makrofachów na tkankę kostną. Przeprowadzone analizy molekularne nie potwierdziły istotnego wpływu badanych frakcji RG-I na ekspresję genu *IL10*, kodującego cytokinę o działaniu immunosupresyjnym w zaktywowanych makrofachach.



Rys. 5.3.1. Relatywny (względny) poziom ekspresji genów *TNFA*, *IL1B*, *IL8* oraz *IL10* oznaczony w pierwotnych ludzkich makrofachach w 6 godzinie od infekcji. Wyniki normalizowano względem genu referencyjnego, kodującego β 2-mikroglobulinę (B2M). Uzyskany wynik jest średnią z dziewięciu niezależnych doświadczeń \pm błąd standardowy (SEM). Różnice uznano jako statystycznie istotne przy $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą [$*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$] w analizie ANOVA.

5.4. Podsumowanie badań *in vitro*

W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że modyfikacja polistyrenowych oraz tytanowych powierzchni hodowlanych z wykorzystaniem RG-I może wpływać na regulację aktywności komórek, które zastymulowano bakteryjnym czynnikiem infekcyjnym. Przeprowadzone badania własne potwierdziły zdolność RG-I do hamowania odpowiedzi prozapalnej oraz stymulacji procesów warunkujących prawidłowy wzrost i przebudowę kości. W badaniach *in vitro* zastosowano zainfekowane hodowle różnych typów komórek. Ponadto analizy procesów komórkowych dokonano w kilku punktach czasowych, co pozwoliło na kompleksową ocenę właściwości przeciwzapalnych RG-I. Należy jednak zaznaczyć, że istnieją pewne ograniczenia przeprowadzonych eksperymentów. W badaniach wykorzystano hodowle komórek w monokulturze. Jest to układ prosty, nieuwzględniający dodatkowych czynników występujących w modelu *in vivo*, takich jak napływ komórek immunokompetentnych do ogniska zapalnego oraz oddziaływania heterotypowe między komórkami, które pełnią istotną rolę w przebudowie tkanki kostnej oraz osteointegracji. Niemniej jednak przeprowadzone badania *in vitro* poszerzają wiedzę eksperymentalną na temat możliwości wykorzystania RG-I do modyfikacji powierzchni tytanowych wszczepów śródkostnych celem uzyskania implantów o właściwościach przeciwzapalnych. Co więcej, wyniki badań *in vitro*, przedstawione w artykule IV oraz V, wskazują, że niemodyfikowany oraz modyfikowany RG-I zwiększa również aktywność osteoblastów oraz fibroblastów, które nie były stymulowane czynnikiem infekcyjnym. Badane pektyny w różnym stopniu stymulowały proliferację komórek, mineralizację macierzy kostnej, promując także ekspresję genów związanych z produkcją ECM oraz różnicowaniem osteoblastów. W odniesieniu do wyników przedstawionych w artykułach I-V, za wysoce prawdopodobne można uznać, że modyfikacja wierzchniej warstwy implantów z użyciem RG-I, zwłaszcza cząsteczek RG-I, które charakteryzują się występowaniem krótkich łańcuchów bocznych arabinozy, pozwoli opracować bioaktywne powierzchnie implantów o działaniu przeciwzapalnym i promującym szybką osteointegrację.

6. Wnioski

Podsumowując, realizacja przedstawionych w dysertacji badań pozwoliła na sformułowanie następującego wniosku ogólnego: zastosowanie niemodyfikowanego oraz enzymatycznie modyfikowanego ramnogalakturonanu-I (z krótszymi bocznymi łańcuchami zawierającymi arabinozę) do pokrywania powierzchni polistyrenowych oraz tytanowych

hamuje odpowiedź prozapalną, indukowaną czynnikiem infekcyjnym oraz stymuluje procesy komórkowe, związane z odbudową tkanki kostnej w warunkach *in vitro*. Wnikliwa analiza odpowiedzi zainfekowanych osteoblastów, fibroblastów i makrofagów pozwoliła na wyciągnięcie wniosków szczegółowych:

- Pokrywanie powierzchni polistyrenowych niemodyfikowanym i modyfikowanym RG-I hamuje prozapalną aktywność zainfekowanych osteoblastów poprzez częściową inhibicję ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne. W wyniku ograniczenia odpowiedzi prozapalnej, niemodyfikowany oraz modyfikowany RG-I stymuluje aktywność proliferacyjną i metaboliczną zainfekowanych osteoblastów, mineralizację macierzy kostnej oraz ekspresję genów odpowiedzialnych za proces osteogenezy.
- Modyfikacja powierzchni polistyrenowych z użyciem RG-I działa supresyjnie na odpowiedź prozapalną zainfekowanych fibroblastów. Badane pektyny hamują ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne, a tym samym stymulują proliferację i aktywność metaboliczną zainfekowanych fibroblastów oraz ekspresję genów związanych z procesem formowania macierzy zewnątrzkomórkowej.
- Obecność niemodyfikowanego oraz modyfikowanego RG-I na powierzchniach polistyrenowych i tytanowych hamuje odpowiedź prozapalną zaktwowanych makrofagów poprzez obniżenie ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne.
- Pokrywanie powierzchni polistyrenowych i tytanowych enzymatycznie modyfikowanym RG-I w większym stopniu ogranicza aktywność prozapalną komórek stymulowanych czynnikiem infekcyjnym w odniesieniu do niemodyfikowanego RG-I.

W oparciu o powyższe wnioski można stwierdzić że ramnagalakturonan-I, szczególnie enzymatycznie modyfikowany, stanowi obiecujący biomateriał do pokrywania tytanowych wszczepów śródkostnych. Za wysoce prawdopodobne można uznać to, że modyfikacja wierzchniej warstwy tytanowych wszczepów z wykorzystaniem cząsteczek RG-I pozwoli uzyskać implanty wykazujące działanie przeciwzapalne oraz promujące proces osteointegracji.

Bibliografia

1. Belibasakis GN. 2014. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Archives of Oral Biology*. 59(1):66-72.
2. Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, Stadlinger B. 2015. Peri-implant infections of oral biofilm etiology. *Biofilm-based healthcare-associated infections*. Springer. str. 69-84.

3. Bussy C, Verhoef R, Haeger A, Morra M, Duval JL, Vigneron P, Bensoussan A, Velzenberger E, Cascardo G, Cassinelli C. 2008. Modulating in vitro bone cell and macrophage behavior by immobilized enzymatically tailored pectins. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 86(3):597-606.
4. Caffall KH, Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 344(14):1879-1900.
5. Gurzawska K, Svava R, Jørgensen NR, Gotfredsen K. 2012a. Nanocoating of titanium implant surfaces with organic molecules. Polysaccharides including glycosaminoglycans. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 8(6):1012-1024.
6. Kokkonen H, Cassinelli C, Verhoef R, Morra M, Schols H, Tuukkanen J. 2008. Differentiation of osteoblasts on pectin-coated titanium. *Biomacromolecules*. 9(9):2369-2376.
7. Koszuta A, Szymańska J, Szpak P. 2012. Leczenie protetyczne z zastosowaniem implantów zębowych. *Polish Journal of Public Health*. 122(2):217-221.
8. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 25(4):402-408.
9. Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Nagel M-D, Della Volpe C, Siboni S, Maniglio D, Brugnara M, Ceccone G, Schols HA. 2004. Effects on interfacial properties and cell adhesion of surface modification by pectic hairy regions. *Biomacromolecules*. 5(6):2094-2104.
10. Munarin F, Guerreiro S, Grellier M, Tanzi M, Barbosa M, Petrini P, Granja P. 2011. Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*. 12(3):568-577.
11. Nagel M-D, Verhoef R, Schols H, Morra M, Knox JP, Ceccone G, Della Volpe C, Vigneron P, Bussy C, Gallet M. 2008. Enzymatically-tailored pectins differentially influence the morphology, adhesion, cell cycle progression and survival of fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1780(7):995-1003.
12. Pińkowska H, Złocińska A. 2014. Pektyny–występowanie, budowa chemiczna i właściwości. *Wiadomości Chemiczne*. 68(7-8):683-700.
13. Pokrowiecki R, Szaraniec B, Chłopek J, Zaleska M. 2014a. Współczesne kierunki badań w zakresie modyfikacji warstwy wierzchniej biomateriałów tytanowych przeznaczonych na śródkostne wszczepy stomatologiczne. *Engineering of Biomaterials*. 17(124):2-10.
14. Pokrowiecki R, Tyski S, Zaleska M. 2014b. Problematyka zakażeń okołowszczepowych. *Postępy Mikrobiologii*. 53(2):123-134.