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

Ocena *in vitro* właściwości przeciwzapalnych ramnogalakturonanu-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

Rozprawa doktorska
Doctoral thesis

mgr inż. ANNA MIESZKOWSKA

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

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

Gliwice 2018

Streszczenie

Sukces leczenia implantologicznego w stomatologii zależy od przebiegu osteointegracji, zdefiniowanej jako bezpośrednie, strukturalne i funkcjonalne połączenie pomiędzy żywą kością a powierzchnią implantu. Jednym z głównych czynników zakłócających osteointegrację jest zapalenie okołowszczepowe wywołane miejscową infekcją bakteryjną. Ryzyko wystąpienia reakcji zapalnej w obrębie tkanek okołowszczepowych jest szczególnie wysokie u pacjentów obciążonych chorobami ogólnoustrojowymi. Współczesne kierunki rozwoju inżynierii biomateriałów koncentrują się na odpowiedniej modyfikacji powierzchni implantów w celu zminimalizowania okołowszczepowych zapaleń. Zastosowanie bioaktywnych związków organicznych, wykazujących właściwości przeciwzapalne do pokrywania powierzchni implantów zwiększa prawdopodobieństwo sukcesu leczenia implantologicznego. Obiecującymi materiałami do modyfikacji wierzchniej warstwy wszczepów są pektyny – roślinne polisacharydy, zwłaszcza frakcja pektyn zwana ramnogalakturonanem-I (RG-I) o potwierdzonych właściwościach przeciwzapalnych.

Podstawę niniejszej dysertacji stanowią trzy spójnie tematycznie oryginalne artykuły. Jej głównym celem było zbadanie wpływu RG-I, który został wyizolowany z ziemniaka, na komórki uczestniczące w inicjacji i regulacji procesu zapalnego oraz zaangażowane w odbudowę tkanki kostnej. Ocenie poddano reakcje komórek stymulowanych bakteryjnym czynnikiem infekcyjnym na powierzchnie polistyrenowe oraz tytanowe, które pokryte zostały niemodyfikowanym oraz enzymatycznie modyfikowanym RG-I (z krótszymi bocznymi łańcuchami, zawierającymi arabinozę).

Celem badawczym, podjętym w pierwszym artykule, było określenie wpływu niemodyfikowanego oraz enzymatycznie modyfikowanego RG-I, pokrywającego polistyrenowe powierzchnie hodowlane, na komórki kościotwórcze (osteoblasty), które poddano infekcji bakteriami *Porphyromonas gingivalis*. W eksperymentach wykorzystano osteoblasty linii MC3T3-E1 oraz pierwotne mysie osteoblasty. Wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* wskazują, że RG-I hamuje odpowiedź prozapalną zainfekowanych osteoblastów poprzez obniżenie ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne. Na powierzchniach pokrytych cząsteczkami RG-I, w stosunku do polistyrenowej powierzchni kontrolnej, odnotowano wzrost proliferacji i aktywności metabolicznej zainfekowanych komórek, przyspieszenie procesu mineralizacji macierzy kostnej oraz wyższy poziom ekspresji genów związanych z procesem tworzenia kości (osteogenezą). Ponadto wykazano, że badane pektyny obniżają zdolność zainfekowanych osteoblastów do ekspresji genu kodującego białko RANKL,

które aktywuje komórki kościogubne (osteoklasty), odpowiedzialne za proces resorpcji tkanki kostnej.

Zdolność niemodyfikowanego oraz enzymatycznie modyfikowanego RG-I do hamowania odpowiedzi prozapalnej potwierdziły badania *in vitro*, które przedstawiono w artykule II. Właściwości przeciwzapalne badanych pektyn określono w odniesieniu do ludzkich fibroblastów, które zainfekowano bakteriami *P.gingivalis*. Uzyskane wyniki wskazują, że modyfikacja polistyrenowej powierzchni hodowlanej cząsteczkami RG-I reguluje aktywność zainfekowanych fibroblastów. W kontakcie z badanymi pektynami, w komórkach stymulowanych czynnikiem infekcyjnym zaobserwowano obniżenie ekspresji genów odpowiedzialnych za inicjację reakcji zapalnej, przy jednoczesnym wzroście proliferacji, aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej oraz ekspresji genów związanych z produkcją składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania pokazały również, że pokrywanie powierzchni cząsteczkami RG-I hamuje ekspresję genu kodującego metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej – enzym proteolityczny, którego wzmożona aktywność w przebiegu procesu zapalnego prowadzi do degradacji struktur kostnych.

W artykule III dokonano oceny wpływu niemodyfikowanego oraz modyfikowanego RG-I zaadsorbowanego na polistyrenowych oraz tytanowych powierzchniach hodowlanych na ludzkie makrofagi zaktywowane czynnikiem infekcyjnym. Makrofagi zaktywowano w dwojaki sposób: poprzez infekcję bakteriami *P. gingivalis* oraz stymulację lipopolisacharydem pochodzącym z bakterii *Escherichia coli*. Uzyskane wyniki badań wskazują, że na powierzchniach polistyrenowych oraz tytanowych, pokrytych badanymi materiałami, makrofagi wykazują niższy próg aktywacji niezależnie od rodzaju zastosowanego czynnika stymulującego. W komórkach odnotowano spadek poziomu ekspresji genów kodujących określone cytokiny prozapalne w porównaniu z komórkami niekontaktowanymi z pektynami. Zredukowana zdolność makrofagów do ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne może zapobiegać nadmiernej resorpcji kości, która towarzyszy reakcji zapalnej. Przeprowadzone badania *in vitro* nie potwierdziły istotnego wpływu RG-I na ekspresję genu kodującego immunosupresyjną interleukinę-10 w aktywowanych makrofagach.

Podsumowując, RG-I wykazuje zdolność do hamowania odpowiedzi prozapalnej, indukowanej bakteryjnym czynnikiem infekcyjnym oraz stymulacji procesów warunkujących prawidłową odbudowę tkanki kostnej w warunkach *in vitro*. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy potwierdzono, że RG-I, który poddany został enzymatycznej modyfikacji polegającej na skróceniu bocznych łańcuchów arabinozy w większym stopniu redukuje odpowiedź prozapalną *in vitro*. Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić,

że RG-I, szczególnie enzymatycznie modyfikowany, wykazuje potencjał do wdrożenia i stosowania w modyfikacji powierzchni tytanowych implantów stomatologicznych. Wskazane jest jednak prowadzenie dalszych badań *in vitro* celem poznania mechanizmu działania przeciwzapalnego RG-I oraz badań *in vivo*, aby zweryfikować możliwość wykorzystania RG-I w implantologii stomatologicznej.