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

ROZPRAWA DOKTORSKA

Wpływ ramnogalakturonanu-I na proces osteointegracji. Badania *in vitro*.

The effect of rhamnogalacturonan-I on osseointegration. *In vitro* study.

mgr inż. Justyna Folkert

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

Kopromotor: dr Katarzyna Gurzawska, University of Birmingham

Gliwice 2018

STRESZCZENIE

Wyzwaniem inżynierii biomateriałów jest opracowanie systemu implantologicznego o wysokiej biozgodności, który zapewniłby trwałe zrośnięcie wszczepu z kością w procesie osteointegracji. Istotny wpływ na przebieg tego procesu ma powierzchnia wszczepu, jej właściwości chemiczne, fizyczne, mechaniczne i topografia. W celu osiągnięcia biomateriału o jak najlepszych właściwościach prowadzone są poszukiwania nowych rozwiązań, obejmujące m. in. różne modyfikacje warstwy wierzchniej implantu. Jednym ze sposobów rozwinięcia powierzchni implantów jest zastosowanie powłok zbudowanych z organicznych związków. Dotychczas przeprowadzone badania *in vitro* wskazują na potencjalną przydatność pektyn, głównie ramnogalakturonanu-I, do modyfikacji powierzchni implantów ze względu na ich właściwości kościotwórcze oraz przeciwzapalne.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu ramnogalakturonanu-I (RG-I) jako biomateriału o potencjalnym zastosowaniu do modyfikacji powierzchni tytanowych implantów śródkostnych na wybrane komórki, uczestniczące w procesie osteointegracji, w warunkach *in vitro.*

W pracy użyto RG-I niemodyfikowanego (PU) oraz RG-I modyfikowanego (PA) o krótszych łańcuchach bocznych arabinozy. Badania wykonano z wykorzystaniem hodowli komórkowych, prowadzonych na polistyrenowych płytkach i/lub dyskach tytanowych, których powierzchnie pokryto PU lub PA. Kontrolę stanowiła hodowla komórek na niezmienionej powierzchni, niepokrytej pektynami. W artykułach I-V opisano wpływ PU i PA na poszczególne typy komórek, odgrywających kluczowe role w przebudowie tkanek, zwłaszcza tkanki kostnej.

W artykule I prezentowane są wyniki otrzymane dla komórek kościotwórczych: mysich osteoblastów pierwotnych oraz mysich osteoblastów linii komórkowej MC3T3-E1. Osteoblasty hodowane na powierzchniach kontrolnych, niepokrytych RG-I oraz pokrytych PU lub PA poddano testom na proliferację, mineralizację macierzy kostnej oraz analizie cyklu komórkowego. Ponadto zbadano poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za różnicowanie i dojrzewanie osteoblastów. Uzyskane wyniki wykazały, że obecność RG-I zwiększa proliferację osteoblastów, wydzielanie przez nie związków wapnia oraz ekspresję genów odpowiedzialnych za proces osteogenezy, przy czym PA oddziałuje silniej na odpowiedź komórkową niż PU.

Artykuł II opisuje wpływ RG-I niemodyfikowanego i modyfikowanego na odpowiedź biologiczną pierwotnych ludzkich fibroblastów. Ocenie poddano zdolność komórek do proliferacji, metaboliczną aktywność, analizę cyklu komórkowego oraz analizę poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za przebudowę ECM i genów pełniących kluczową rolę w osteogenezie. Wyniki badań pokazały, iż PU i PA powoduje wzmożenie proliferacji fibroblastów, ich aktywności metabolicznej oraz ekspresji genów związanych z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej, jednakże wartości uzyskane dla komórek hodowanych na PA były wyższe niż dla tych hodowanych na PU.

Ponadto w artykule II zamieszczono charakterystykę powierzchni polistyrenowych, pokrytych niemodyfikowanym lub modyfikowanym RG-I oraz kontrolnych, niepokrytych RG-I. Badania przeprowadzono w oparciu o techniki spektroskopii fotoelektronów, skaningowej mikroskopii elektronowej, mikroskopii sił atomowych oraz pomiar zwilżalności. Dokonano analizy składu chemicznego, zwilżalności oraz topografii powierzchni. Otrzymane wyniki pokazały, że obecność RG-I wpływa na właściwości powierzchni, takie jak: skład chemiczny, zwilżalność i chropowatość, w efekcie oddziałując na odpowiedź komórkową na badanej powierzchni.

Przedmiotem badań *in vitro*, przedstawionych w artykule III, jest ocena wpływu RG-I niemodyfikowanego oraz modyfikowanego na pierwotne ludzkie neutrofile. Przed przystąpieniem do badań, komórki stymulowano z użyciem lipopolisacharydu (LPS) ze szczepu *E. coli* lub bakterii *P. gingivalis*. Komórki hodowano na powierzchniach polistyrenowych oraz dyskach tytanowych pokrytych PU lub PA oraz niepokrytych RG-I, stanowiących powierzchnie kontrolne. Przeprowadzone analizy wykazały, że PU i PA obniżają poziom ekspresji genów kodujących cytokiny przeciwzapalne i prozapalne, przy czym niższe wartości uzyskano dla komórek hodowanych na powierzchniach pokrytych PA.

Dodatkowo w artykułach IV oraz V zostały przedstawione wyniki poziomu ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne produkowane przez mysie osteoblasty oraz ludzkie fibroblasty. Wykazano, że obecność PU i PA obniża poziom ekspresji tych genów.

Podsumowując, wyniki przedstawione w artykułach pokazują, że RG-I wpływa na odpowiedź biologiczną testowanych komórek. Przeprowadzone badania *in vitro* sugerują, że ramnogalakturonan-I cechuje się dobrą biozgodnością. Zastosowanie RG-I do modyfikacji warstwy wierzchniej implantów stomatologicznych może znacząco poprawić jego osteointegrację, zwiększając stabilność i funkcjonalność.