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

ROZPRAWA DOKTORSKA

OBSZERNE STRESZCZENIE

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

Podstawę niniejszej pracy doktorskiej stanowią następujące artykuły:

Artykuł I

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

Artykuł II

Folkert J, Mieszkowska A, Gaber T, Miksch K, Dirscherl K, Gurzawska K. Surface nanocoating with plant-derived pectins improves fibroblast response *in vitro*. Praca przyjęta do druku w czaspopiśmie Starch. DOI:10.1002/star.201800162.

Artykuł III

Folkert J, Mieszkowska A, Burke B, Addison O, Gurzawska K. 2018. Plant-derived, Rhamnogalacturonan-I's modulate proinflammatory cytokine gene expression in neutrophils stimulated by *E. coli* LPS and *P. gingivalis* bacteria. Engineering of Biomaterials. 21(144):2-7.

W pracy doktorskiej zamieszczono także dwa artykuły, które stanowią uzupełnienie przedstawionego tematu, jednakże nie stanowią bezpośredniej podstawy niniejszej pracy doktorskiej.

Artykuł IV

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

Artykuł V

Mieszkowska A, **Folkert J**, Gaber T, Miksch K, Gurzawska K. 2017. Pectin nanocoating reduces proinflammatory fibroblast response to bacteria. J Biomed Mater Res Part A. 105A: 3475-3481.

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

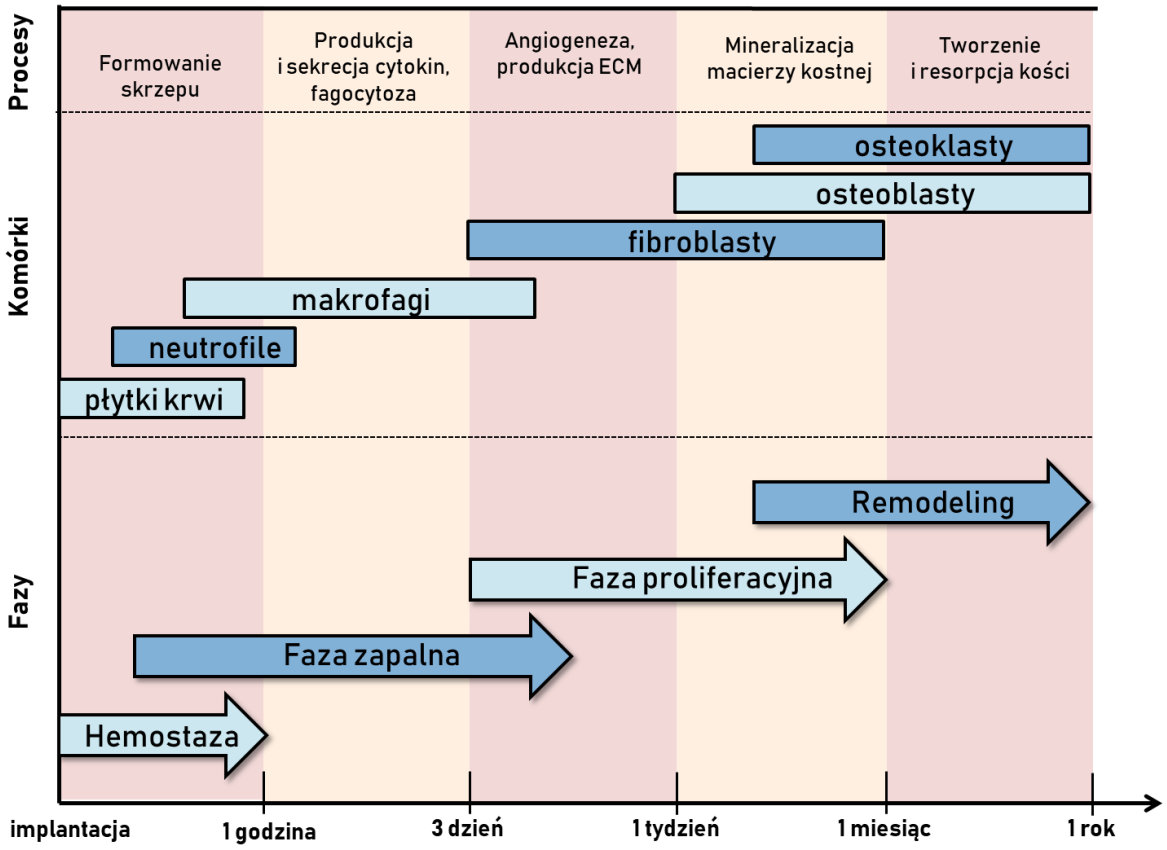
Wykaz skrótów

W niniejszej pracy nazwy (skróty nazw) genów ludzkich są pisane czcionką pochyloną i wielkimi literami zgodnie z nomenklaturą wprowadzoną przez Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee. Nazwy (skróty nazw) genów mysich są pisane czcionką pochyloną i małymi literami poprzedzonymi pierwszą wielką literą.

ANOVA	analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)
Ara	L-arabinoza (ang. *arabinose)*
BrdU	5-bromo-2′-deoksyurydyna (ang. *5-bromo-2′-deoxyuridine*)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*)
FACS	sortowanie komórek aktywowane fluorescencją (ang. *fluorescence activated cell sorting*)
GAGs	glikozaminoglikany (ang. *glycosaminoglycans*)
Gal	D-galaktoza (ang. *galactose*)
GalA	kwas α-D-glakturonowy (ang. *galacturonic acid*)
LPS	lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*)
Real-Time PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction*)
RG-I	ramnogalakturonan-I (ang. *rhamnogalacturonan-I*)
Rha	L-ramnoza (ang. *rhamnose*)
Sa	średnia arytmetyczna rzędnych profilu (ang. *average height deviation*)
SEM	błąd standardowy średniej (ang. *standard error of the mean*)
Sq	średnia kwadratowa rzędnych profilu (ang. *root mean square height*)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumour necrosis factor alpha*)
WST-1	rozpuszczalna w wodzie sól tetrazolowa (ang. *water soluble tetrazolium salt*)

1. Wprowadzenie

Wyzwaniem inżynierii biomateriałów jest opracowanie systemu implantologicznego o wysokiej biozgodności, który zapewniłby trwałe zrośnięcie wszczepu z kością w procesie osteointegracji. Osteointegracja, zgodnie z definicją Brånemarka, to bezpośrednie strukturalne i funkcjonalne połączenie pomiędzy kością a powierzchnią wszczepu (Albrektsson i in., 1981). Proces ten jest dynamiczny, wieloetapowy, zależny od wielu czynników, a jego przebieg jest niezbędny w regeneracji tkanki kostnej. U podłoża osteointegracji leży szereg kolejno następujących reakcji komórkowych, które można podzielić na cztery fazy: hemostaza, faza zapalna, faza proliferacyjna oraz remodeling (Rys. 1.1.).



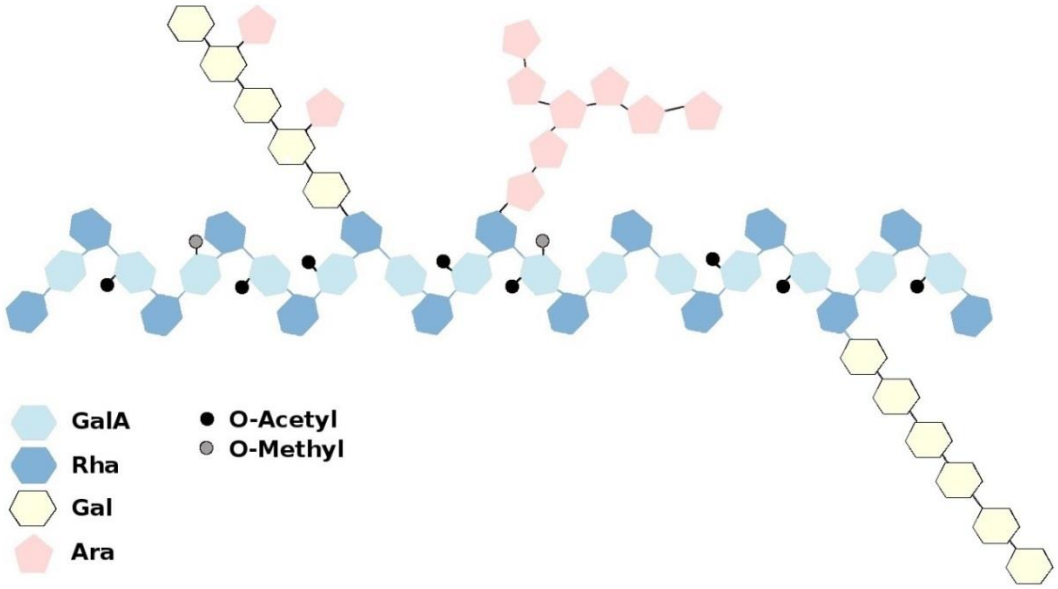
Rys. 1.1. Schemat przebiegu procesu osteointegracji.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Majewski i Majewski 2009. Biologiczne mechanizmy przebudowy struktur kostnych i gojenia tkanek miękkich jamy ustnej po zabiegach implantacyjnych. Implantoprotetyka. 10(1):3-7.

Istotny wpływ na przebieg 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.

Ramnogalakturonan-I (RG-I) jest rozgałęzionym polimerem, stanowiącym od 20 do 35% pektyn znajdujących się w roślinnej ścianie komórkowej. Jego szkielet zbudowany jest z naprzemiennie połączonych reszt kwasu α-D-galakturonowego i L-ramnozy (Rys. 1.2.). Kwas galakturonowy nie jest zazwyczaj miejscem wiązania bocznych odgałęzień. W łańcuchu bocznym ramnozy mogą natomiast występować liniowe lub rozgałęzione reszty D-galaktozy, L-arabinozy lub arabinogalaktany (Morra i in., 2004; Cankar i in., 2014; Pińkowska i Złocińska, 2014). W resztach kwasu galakturonowego mogą występować grupy acetylowe, jak również grupy metylowe w zależności od źródła pozyskania RG-I (Pińkowska i Złocińska 2014).



Rys. 1.2. Schemat przedstawiający strukturę chemiczną cząsteczki ramnogalakturonanu-I.

Zastosowano oznaczenia: GalA – kwas α-D-galakturonowy, Rha – L-ramnoza, Gal – D-galaktoza, Ara – L-arabinoza, O-Acetyl – grupy acetylowe, O-Methyl – grupy metylowe.

Źródło: Cankar K, Kortstee A, Toonen MA, Wolters-Arts M, Houbein R, Mariani C, Ulvskov P, Jorgensen B, Schols HA, Visser RG. 2014. Pectic arabinan side chains are essential for pollen cell wall integrity during pollen development. Plant biotechnology journal. 12(4):492-502.

Struktura RG-I może być łatwo enzymatycznie modyfikowana, co prowadzi do zmiany jej właściwości fizykochemicznych tj. składu, rozgałęzienia i długości łańcuchów bocznych oraz masy cząsteczkowej. Możliwość zmiany struktury ramnogalakturonanu-I, a tym samym jej właściwości powoduje, iż RG-I znalazło zastosowanie jako materiał do pokrywania implantów stomatologicznych (Gurzawska i in., 2012a). Liczne badania potwierdziły wpływ ramnogalakturonanu-I na adhezję, morfologię oraz proliferację różnego typu komórek w zależności od jego składu chemicznego (Bussy i in., 2008; Gurzawska i in., 2012a; Gurzawska i in., 2014; Kokkonen i in., 2008). W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę oceny wpływu ramnogalakturonanu-I na proces osteointegracji w oparciu o przeprowadzone badania *in vitro*.

2. Cel pracy

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

Główny cel pracy zrealizowano w oparciu o cele szczegółowe, których realizację omówiono w poszczególnych artykułach.

W artykule I oceniono wpływ niemodyfikowanego i modyfikowanego RG-I (z krótszymi łańcuchami bocznymi zbudowanymi z

arabinozy) na aktywność osteoblastów poprzez pomiar ich proliferacji, analizę cyklu komórkowego, określenie stopnia mineralizacji macierzy kostnej, a także zbadanie poziomu ekspresji genów kodujących markery różnicowania i dojrzewania osteoblastów oraz genu kodującego mediatory resorpcji kości.

W artykule II zbadano wpływ niemodyfikowanego i modyfikowanego RG-I na fibroblasty poprzez ocenę ich proliferacji, aktywności metabolicznej, analizę cyklu komórkowego oraz poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych głównie za przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. Scharakteryzowano również właściwości testowanych powierzchni, tj. skład chemiczny, zwilżalność oraz topografię.

W artykule III określono wpływ niemodyfikowanego i modyfikowanego RG-I na aktywność neutrofili poprzez pomiar poziomu ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne i przeciwzapalne.

3. Pokrywanie polistyrenowych i tytanowych powierzchni niemodyfikowanym i modyfikowanym RG-I

Materiał badawczy stanowił ramnogalakturonan-I (RG-I) wyizolowany z ziemniaka zgodnie z procedurą przedstawioną w literaturze (Gurzawska i in., 2014). RG-I poddano enzymatycznej modyfikacji w celu usunięcia ze struktury łańcuchów bocznych zbudowanych z arabinozy, uzyskując modyfikowany RG-I.

W badaniach użyto RG-I modyfikowanego, jak również niemodyfikowanego. Zawartość monosacharydów oraz kwasów cukrowych w niemodyfikowanym i modyfikowanym RG-I przedstawiono w tabeli 3.1.

Tab 3.1. Zawartość monosacharydów i kwasów cukrowych w niemodyfikowanym oraz enzymatycznie modyfikowanym RG-I.

Cukier	RG-I niemodyfikowany (mol %)	RG-I modyfikowany (mol %)
Arabinoza	10.9	4.3
Galaktoza	70.7	76.7
Ramnoza	10.9	12.3
Kwas galakturonowy	7.5	6.7
Całość	100	100

RG-I niemodyfikowany i modyfikowany zastosowano do pokrycia powierzchni polistyrenowych [artykuł I,II,III] oraz powierzchni dysków tytanowych [artykuł III], które wykorzystano do badań *in vitro*. Do pokrycia badanych powierzchni niemodyfikowanym RG-I oraz modyfikowanym RG-I wykorzystano zjawisko adsorpcji fizycznej [artykuł I]. Detekcję cząsteczek RG-I przyłączonych do polistyrenowych powierzchni przeprowadzono przed przystąpieniem do badań *in vitro* oraz po ich zakończeniu przy użyciu testu immunoenzymatycznego [artykuł I].

4. Charakterystyka polistyrenowych powierzchni kontrolnych, niepokrytych RG-I oraz pokrytych niemodyfikowanym i modyfikowanym RG-I

Właściwości warstwy wierzchniej biomateriału w znacznym stopniu wpływają na oddziaływania pomiędzy biomateriałem a komórkami. Do istotnych parametrów zaliczyć można skład chemiczny, zwilżalność oraz topografię powierzchni. W celu scharakteryzowania polistyrenowych powierzchni kontrolnych, niepokrytych RG-I oraz pokrytych niemodyfikowanym i modyfikowanym RG-I, wykorzystano spektroskopię fotoelektronów, pomiar kąta zwilżania, skaningową mikroskopię elektronową, oraz mikroskopię sił atomowych. Parametry takie jak: hydrofilowość/hydrofobowość, obecność grup funkcyjnych czy chropowatość wpływają na adsorpcję białek, adhezję komórek, ich morfologię, orientację w przestrzeni, podział i różnicowanie (Nowacka, 2012).

W artykule II scharakteryzowano właściwości polistyrenowych powierzchni kontrolnych, niepokrytych RG-I oraz pokrytych niemodyfikowanym lub modyfikowanym RG-I (tabela 4.2.).

Tab 4.2. Wyniki pomiarów wskaźnika O/C, kąta zwilżania oraz chropowatości

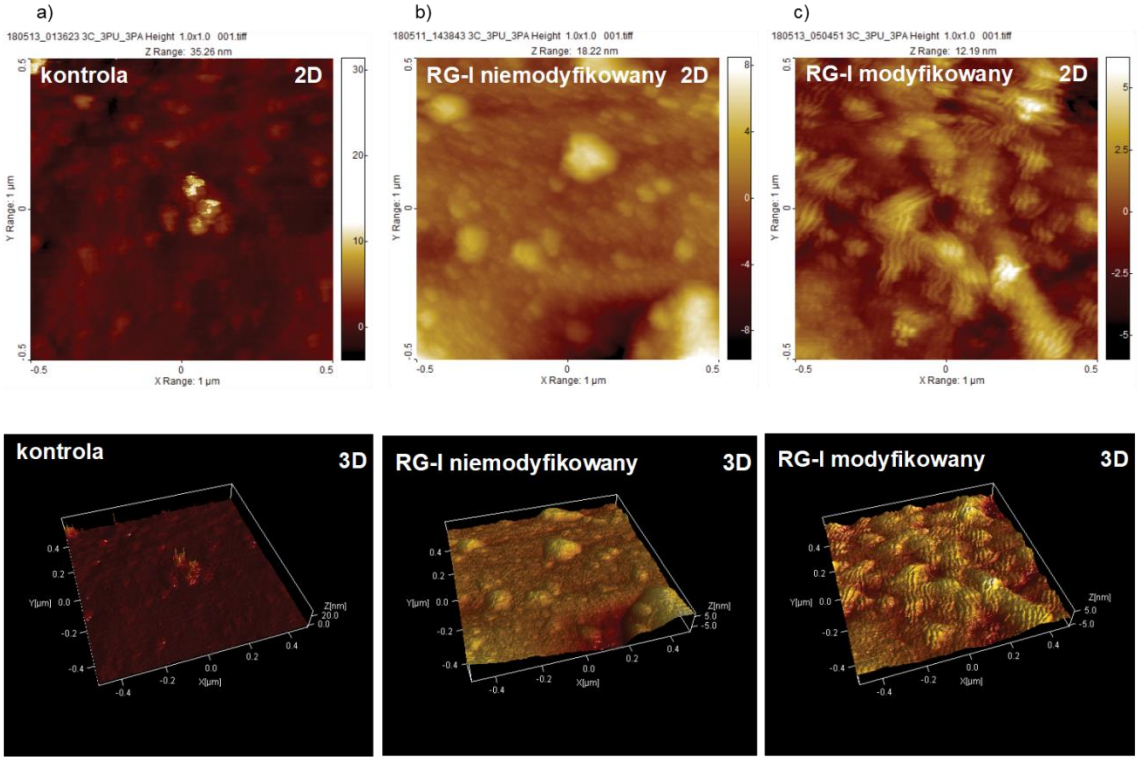
n=6	wskaźnik O/C	kąt zwilżania	chropowatość			
Mean (± SEM)	[-]	[°]	Sa [nm] 1×1µm	Sq [nm] 1×1µm	Sa [nm] 20×20µm	Sq [nm] 20×20µm
Kontrola	0,009 (0,001)	57,3 (0,7)	1,13	1,63	2,94	4,07
RG-I niemodyfikowany	0,224 (0,006) ***	44,4 (2,3) ***	1,32	1,88	3,26	4,34
RG-I modyfikowany	0,226 (0,004) ***	42,6 (1,4) ***	1,99	3,01	3,23	4,64

Sa – średnia arytmetyczna rzędnych profilu (ang. average height deviation),

Sq – średnia kwadratowa rzędnych profilu (ang. root mean square height).

Dokonano analizy składu chemicznego z zastosowaniem spektroskopii fotoelektronów, która potwierdziła obecność RG-I na powierzchniach testowych na podstawie odnotowanego wzrostu wskaźnika O/C w porównaniu do powierzchni kontrolnych. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z teorią, że obecność polisacharydów na powierzchni charakteryzuje się wysokim stosunkiem tlenu do węgla (Morra i in., 2004). Obecność RG-I na badanych powierzchniach potwierdził także test immunoenzymatyczny opisany w artykule I. Ponadto została przeprowadzona analiza zwilżalności oraz topografii powierzchni. Na rysunku 4.1. przedstawiono obrazy 2D i 3D powierzchni polistyrenowych

niepokrytych RG-I oraz pokrytych niemodyfikowanym lub modyfikowanym RG-I. Badania wykazały, że powierzchnie pokryte ramnogalakturonanem-I charakteryzują się niższym kątem zwilżania oraz wyższymi parametrami chropowatości: Sa (średnia arytmetyczna rzędnych profilu) oraz Sq (średnia kwadratowa rzędnych profilu) w odniesieniu do powierzchni kontrolnych. Wyniki te wskazują, że zastosowanie zarówno RG-I niemodyfikowanego, jak również modyfikowanego zmienia właściwości powierzchni, wpływając na zwiększenie hydrofilności oraz chropowatości. Uzyskanie takich parametrów jest kluczowe dla adsorpcji białek, a w następstwie adhezji komórek, jak również ich podziału i namnażania (Nowacka, 2012). W artykułach I-III przedstawiono wpływ niemodyfikowanego oraz modyfikowanego RG-I na odpowiedź biologiczną osteoblastów, fibroblastów i neutrofili.



Rys. 4.1. Reprezentatywne obrazy 2D i 3D powierzchni (a) niepokrytych RG-I, (b) pokrytych RG-I niemodyfikowanym, (c) pokrytych RG-I modyfikowanym wykonane przy użyciu mikroskopu sił atomowych.

5. Badania *in vitro* wpływu ramnogalakturonanu-I na proces osteointegracji

W celu określenia wpływu badanych materiałów na przebieg procesu osteointegracji, przeprowadzono badania *in vitro* z wykorzystaniem hodowli następujących komórek: mysich osteoblastów pierwotnych, mysich osteoblastów linii komórkowej MC3T3-E1, pierwotnych ludzkich fibroblastów oraz neutrofili. Wymienione typy komórek wybrano ze względu na ich kluczową rolę w procesie osteointegracji. Schemat przeprowadzonych testów przedstawiono na rysunku 5.1.

Osteoblasty poddano testom na proliferację metodą BrdU, w której stosuje się 5-bromo-2'-deoksyurydynę, mineralizację macierzy kostnej z wykorzystaniem czerwieni alizarynowej barwiącej depozyty wapniowe oraz analizie cyklu komórkowego z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Zbadano także poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za różnicowanie i dojrzewanie komórek z wykorzystaniem metody łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR). Określono wpływ badanych materiałów na ekspresję genów kodujących markery różnicowania i dojrzewania osteoblastów (*Alpl, Col1a1, Bglap, Runx2*) oraz mediatory resorpcji kości (*Rankl*). Przed przystąpieniem do analiz Real-Time PCR wyizolowano całkowite RNA z hodowli osteoblastów i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji. W celu wyznaczenia względnego poziomu ekspresji badanych genów zastosowano metodę $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak i Schmittgen, 2001).

Hodowlę pierwotnych ludzkich fibroblastów wykorzystano do przeprowadzenia badań mających na celu ocenę zdolności do proliferacji, ocenę metabolicznej aktywności przy użyciu testu redukcji soli tetrazolowych zawartych w roztworze WST-1, analizę cyklu komórkowego oraz analizę poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM): *COL1A1, FN1, MMP2* i genów pełniących kluczową rolę w osteogenezie: *BMP7, FGFR1*.

Badania z użyciem pierwotnych ludzkich neutrofili poprzedzono aktywowaniem komórek poprzez zastosowanie lipopolisacharydu (LPS) *E. coli* O26:B6 lub bakterii *P. gingivalis*. Następnie określono poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję cytokin prozapalnych (*IL1B, IL8, TNFA*) i przeciwzapalnych (*IL10*) w nieaktywowanych oraz aktywowanych neutrofilach.

Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych ± SEM (błąd standardowy średniej). Analizę statystyczną wyników wykonano w oparciu

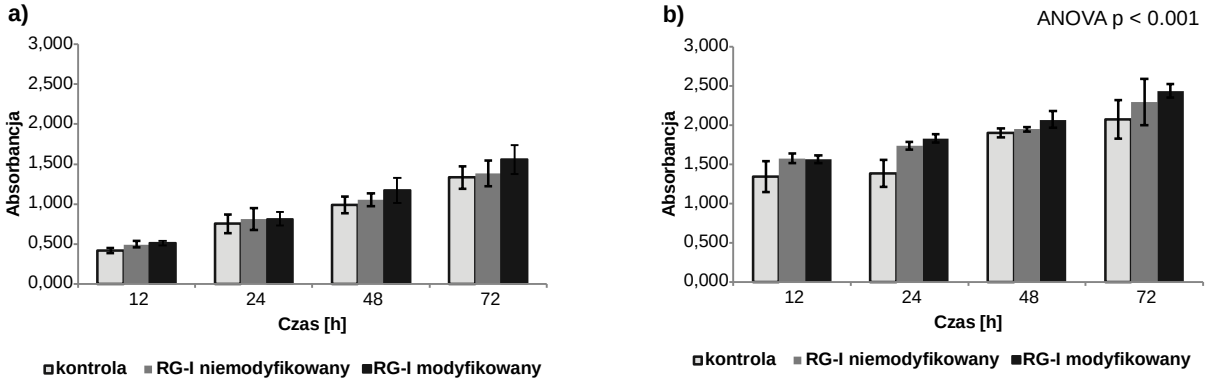
o jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz testu Bonferroniego przy poziomie istotności $p < 0.05$ z użyciem programu SPSS w wersji 11.5.

Rys 5.1. Schemat przedstawiający kolejne etapy badań *in vitro*.

5.1 Badania *in vitro* z użyciem pierwotnych mysich osteoblastów oraz osteoblastów linii komórkowej MC3T3-E1

W artykule I opisano wpływ RG-I niemodyfikowanego oraz modyfikowanego na mysie osteoblasty. Są to komórki kościotwórcze determinujące odpowiedź tkanki kostnej na badany biomateriał (Kokkonen i in., 2007). Osteoblasty pełnią kluczową rolę w procesie osteointegracji, gdyż są odpowiedzialne za syntezę oraz mineralizację macierzy kostnej (Kokkonen i in., 2007; Stawińska i in., 2005). Badania prowadzono z zastosowaniem osteoblastów pierwotnych wyizolowanych z kości czaszki myszy oraz linii komórkowej MC3T3-E1.

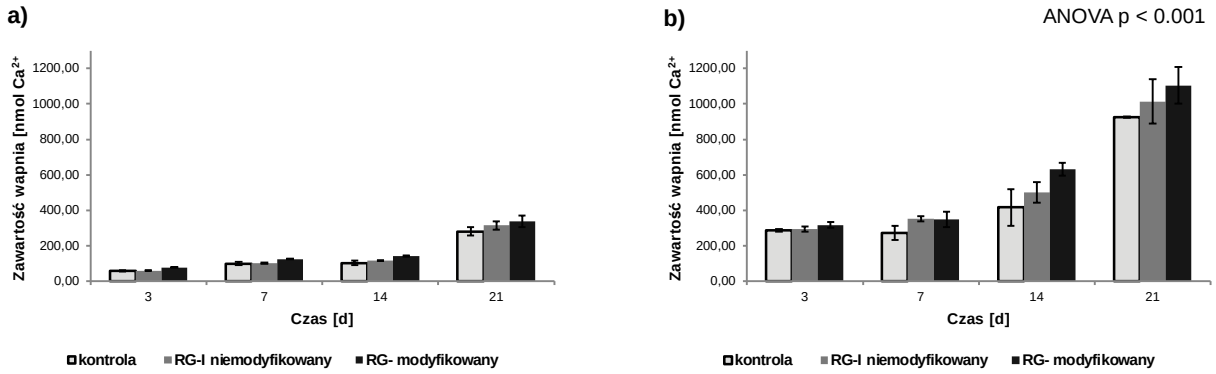
Otrzymane wyniki dowiodły, iż zarówno osteoblasty pierwotne, jak i MC3T3-E1 są wrażliwe na obecność RG-I na powierzchniach polistyrenowych. Na podstawie przeprowadzonych testów w 12, 24, 48 oraz 72 godzinie hodowli wykazano, iż zdolność do proliferacji osteoblastów wzrastała w kolejnych punktach czasowych (Rys. 5.1.1.).Wyniki wskazują na najbardziej sprzyjające warunki do podziałów komórkowych na powierzchniach pokrytych cząsteczkami RG-I modyfikowanego, a następnie na powierzchniach pokrytych RG-I niemodyfikowanym. Pomiar stopnia proliferacji nie wykazał jednak istotnych statystycznie różnic, podobnie jak analiza cyklu komórkowego wykonana w 48 i 72 godzinie hodowli. Przeprowadzone badania własne należą do pierwszych, które ukazują wpływ pektyn na proliferację i cykl komórkowy osteoblastów.



Rys. 5.1.1. Aktywność proliferacyjna (a) pierwotnych mysich osteoblastów (b) linii komórkowej MC3T3-E1 w 12, 24, 48 oraz 72 godzinie.

Uzyskane wyniki przedstawiono jako zmierzone wartości absorbancji przy długości fal 450 nm i 650 nm (pomiar referencyjny). Wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń ± 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.

Hodowlę osteoblastów zastosowano również do zbadania poziomu mineralizacji macierzy kostnej w 3, 7, 14 oraz 21 dniu hodowli prowadzonej na powierzchniach kontrolnych oraz pokrytych cząsteczkami RG-I. Zawartość jonów wapnia w hodowlach osteoblastów wzrastała w kolejnych punktach czasowych, na powierzchniach pokrytych RG-I modyfikowanym zawartość jonów wapnia była najwyższa, a na powierzchniach kontrolnych najniższa (Rys. 5.1.2.). Detekcja depozytów wapniowych nie wykazała jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami uzyskanymi dla RG-I a wartościami uzyskanymi dla kontroli.



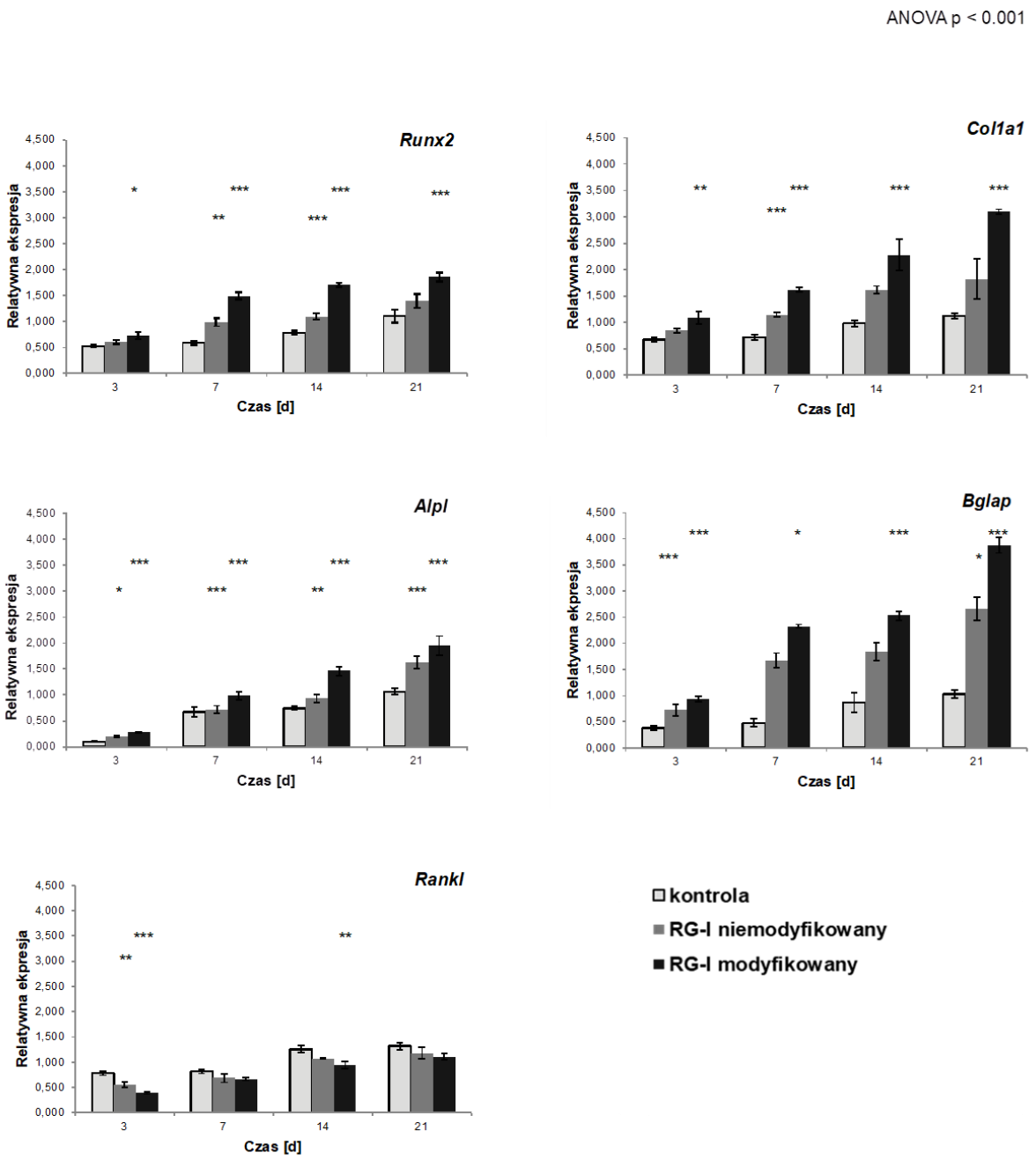
Rys. 5.1.2. Zawartość jonów wapnia oznaczona w hodowli (a) pierwotnych mysich osteoblastów (b) linii komórkowej MC3T3-E1 w 3, 7, 14 i 21 dniu.

Uzyskany wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń ± 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 celu potwierdzenia oddziaływania RG-I na aktywność komórkową, zmierzono poziom ekspresji genów kodujących markery różnicowania i dojrzewania osteoblastów oraz mediatory resorpcji kości w 3, 7, 14 oraz 21 dniu hodowli. Poziom ekspresji *Runx2, Col1a1, Alpl* oraz *Bglap* wzrastał w kolejnych punktach czasowych, osiągając najwyższe wartości dla komórek hodowanych na powierzchniach pokrytych RG-I modyfikowanym, a najniższe dla komórek hodowanych na powierzchniach kontrolnych (Rys 5.1.3.). Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała znaczące różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla RG-I niemodyfikowanego oraz modyfikowanego w odniesieniu do kontroli. Zwiększenie ekspresji *Runx2* w komórkach hodowanych na powierzchniach pokrytych RG-I wydaje się być szczególnie istotne ze względu na pełnione przez niego funkcje w komórce: kontrolę proliferacji, wzrostu i różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w dojrzałe

komórki kości, a także regulację ekspresji genów kodujących główne białka macierzy kostnej: kolagen typu I, osteopontynę, osteokalcynę, czy sialoproteinę kostną (Neve i in., 2011; Witkowska-Zimny i in., 2009). Wyższy poziom ekspresji genów *Col1a1, Alpl, Bglap* w osteoblastach hodowanych na powierzchniach pokrytych RG-I wskazuje, iż obecność pektyn może stymulować proces mineralizacji macierzy kostnej, który jest kluczowy w odbudowie kości. Również poziom ekspresji *Rankl* osiągał coraz większe wartości w kolejnych punktach czasowych, jednakże odnotowano niższe wartości dla osteoblastów hodowanych na RG-I niemodyfikowanym oraz modyfikowanym w porównaniu z komórkami hodowanymi na kontroli. Badania własne, prowadzone przez 21 dni, dały możliwość spojrzenia z szerszej perspektywy na analizowany proces mineralizacji macierzy kostnej. Wyniki przedstawione w niniejszej dysertacji wskazują na stymulujące działanie niemodyfikowanego i modyfikowanego RG-I na ekspresję genów odpowiedzialnych za osteogenezę, przy jednoczesnej inhibicji ekspresji genu związanego z resorpcją kości. Niemniej jednak oba te procesy, jak również równowaga pomiędzy nimi jest kluczowa dla prawidłowego przebiegu procesu regeneracji tkanki kostnej (Rucci, 2008).

Reasumując, przeprowadzone badania pokazały, iż stosowanie RG-I wpływa stymulująco na proliferację osteoblastów, wydzielanie jonów wapnia podczas mineralizacji oraz ekspresję genów, biorących udział w procesie tworzenia kości. Ponadto zaobserwowano, że modyfikowany RG-I o krótszych łańcuchach bocznych arabinozy silniej oddziałuje na badane komórki.



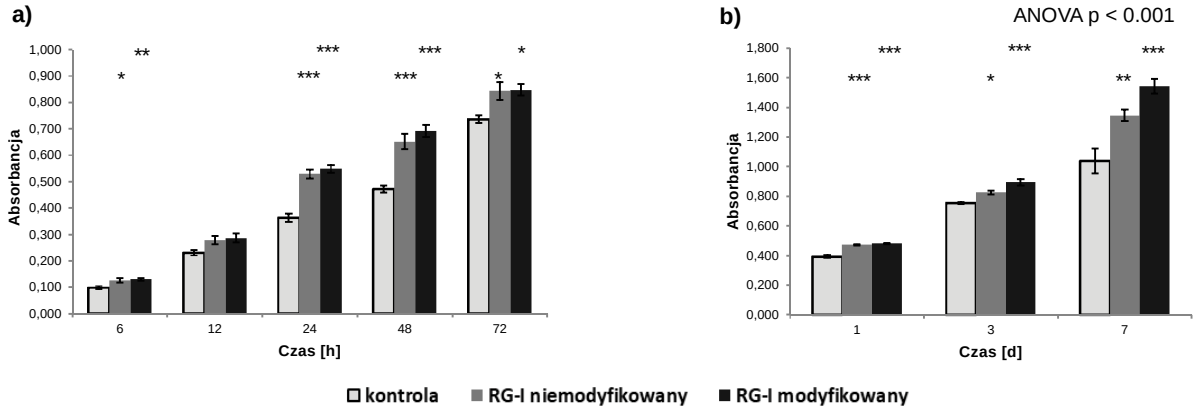
Rys 5.1.3. Relatywny (względny) poziom ekspresji genów *Runx2, Col1a1, Alpl, Bglap* oraz *Rankl* oznaczony w mysich osteoblastach pierwotnych w 3, 7, 14 i 21 dniu.

Wyniki normalizowano względem genu referencyjnego, kodującego β-aktynę (*Actb*). Uzyskany wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń ± 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. Badania *in vitro* z użyciem pierwotnych ludzkich fibroblastów

W artykule II przedstawiono wpływ niemodyfikowanego oraz modyfikowanego RG-I na pierwotne ludzkie fibroblasty wyizolowane z tkanki dziąsła. Fibroblasty pełnią ważną funkcję w procesie odbudowy kości, gdyż uczestniczą w przebudowie ECM, fazie proliferacyjnej oraz tworzeniu nowych naczyń krwionośnych (Kendall i Feghali-Bostwick 2014; Theilgaard-Mönch i in., 2004).

Badanie stopnia proliferacji fibroblastów przeprowadzone zostało w 6, 12, 24, 48 i 72 godzinie hodowli przy użyciu testu BrdU. Zdolność do proliferacji fibroblastów wrastała w kolejnych punktach czasowych, przyjmując najwyższe wartości dla komórek hodowanych na powierzchniach pokrytych modyfikowanym RG-I, a najniższe na powierzchniach kontrolnych. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku analizy aktywności metabolicznej fibroblastów prowadzonej w 1, 3 oraz 7 dniu inkubacji (Rys 5.2.1.).

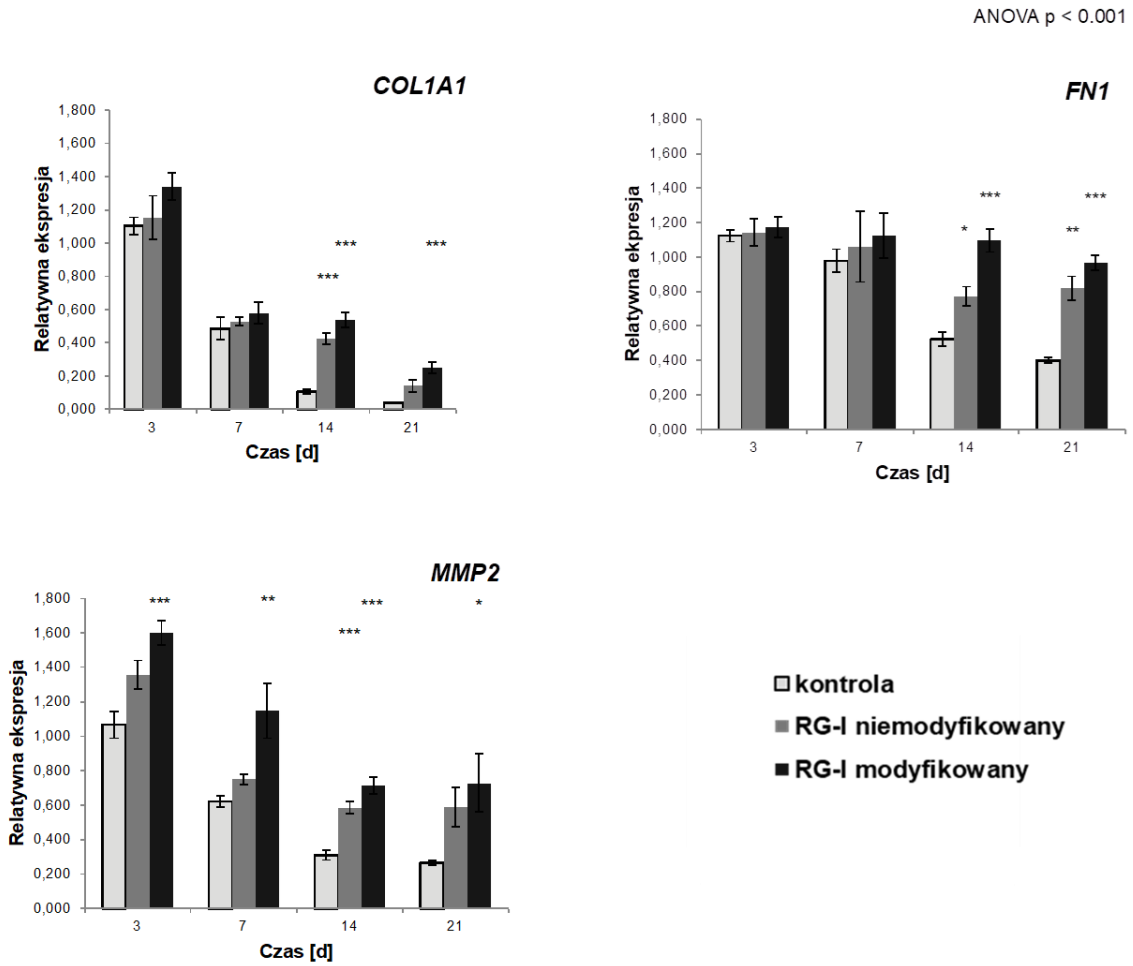


Rys 5.2.1 Aktywność (a) proliferacyjna pierwotnych ludzkich fibroblastów w 12, 24, 48 oraz 72 godzinie hodowli oraz (b) metaboliczna w 3, 7, 14 oraz 21 dniu hodowli.

Uzyskane wyniki przedstawiono jako zmierzone wartości absorbancji przy długości fal 450 nm i 650 nm (pomiar referencyjny). Wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń ± 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.

Badanie wpływu RG-I na ludzkie fibroblasty przeprowadzono także w oparciu o pomiar poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za osteogenezę oraz remodeling macierzy zewnątrzkomórkowej. W niniejszej pracy analizie poddano m.in. geny: *COL1A1*; *FN1* oraz *MMP2*. Poziom ekspresji badanych genów przedstawiono na rysunku 5.2.2. Najwyższe wartości poziomu ekspresji wszystkich genów zaobserwowano w 3 dniu, następnie odnotowano spadek. We wszystkich punktach czasowych poziom ekspresji genów

był najwyższy dla komórek hodowanych na powierzchniach pokrytych modyfikowanym RG-I, a najniższy dla komórek na powierzchniach kontrolnych. Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi na RG-I modyfikowanym i niemodyfikowanym w porównaniu z kontrolą.



Rys 5.2.2. Relatywny (względny) poziom ekspresji genów *COL1A1, FN, MMP2* oznaczony w pierwotnych ludzkich fibroblastach w 3, 7, 14 i 21 dniu hodowli.

Wyniki normalizowano względem genu referencyjnego, kodującego β-aktynę (*ACTB*). Uzyskany wynik jest średnią z sześciu niezależnych doświadczeń ± 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.

Otrzymane wyniki wskazują, iż pektyny mogą promować syntezę ECM poprzez zwiększenie poziomu ekspresji genów kodujących kolagen oraz fibronektynę – kluczowe składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Produkcja protein ECM przez fibroblasty w fazie proliferacyjnej jest istotna także ze względu na stymulację komórek osteoprogenitorowych do migrowania w kierunku implantu. (Zarb i in., 2014).

Jednakże dla prawidłowego przebiegu odbudowy tkanki kostnej niezbędne jest zachowanie równowagi pomiędzy procesami syntezy i degradacji. Najistotniejszą rolę w procesie degradacji komponentów ECM pełnią metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej MMPs (Kendall i Feghali-Bostwick, 2014). Przeprowadzone badania wykazały wyższy poziom ekspresji genu *MMP2* w fibroblastach hodowanych na powierzchniach pokrytych RG-I, niż w komórkach na powierzchniach kontrolnych. Pozwala to stwierdzić, iż ramnogalakturnan-I może stymulować przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, promując zarówno procesy syntezy, jak i degradacji.

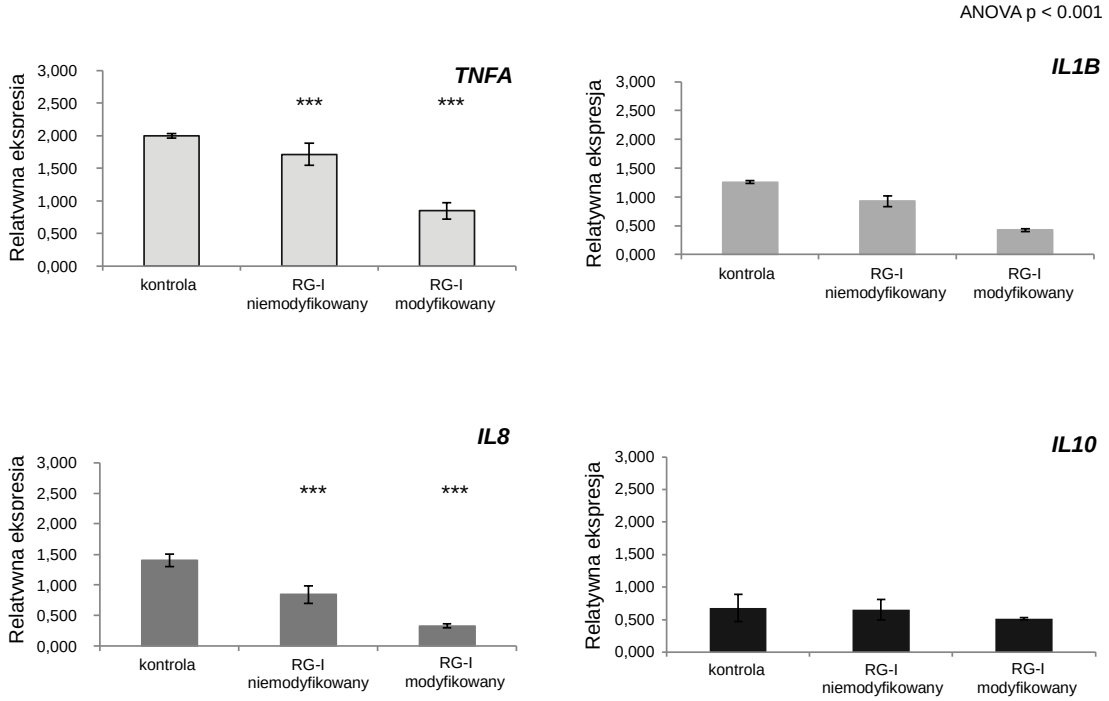
Podsumowując, zastosowanie RG-I stymuluje proliferację fibroblastów, ich aktywność metaboliczną oraz zwiększa poziom ekspresji genów zaangażowanych w osteogenezę oraz przebudowę ECM. Procesy te są silniej stymulowane w przypadku RG-I modyfikowanego.

5.3. Badania *in vitro* z użyciem pierwotnych ludzkich neutrofili

W artykule III podjęto próbę oceny wpływu niemodyfikowanego i modyfikowanego ramnogalakturonanu-I na pierwotne ludzkie neutrofile wyizolowane z krwi obwodowej. Neutrofile są jednymi z pierwszych komórek układu odpornościowego, które pojawiają się w miejscu uszkodzenia tkanki lub wystąpienia bakterii (Theilgaard-Mönch i in., 2004). Pojawienie się patogenów lub ciała obcego aktywuje komórki układu odpornościowego, co prowadzi do produkcji cytokin prozapalnych, tj. interleukiny 1α/β, 8, 12, czynnika martwicy nowotworów α, interferonu α oraz cytokin przeciwzapalnych, tj. interleukiny 10 (Cassatella i in., 1997). W celu określenia wpływu RG-I na odpowiedź neutrofili zbadano poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję cytokin pro i przeciwzapalnych. Ocena intensywności wydzielania tych cytokin jest szczególnie ważna w ustaleniu biozgodności stosowanych biomateriałów, gdyż ich nadmierna produkcja może prowadzić do zniszczenia tkanki i przedwczesnej utraty implantu. Mediatory reakcji zapalnej aktywują osteoklasty zaangażowane w resorpcję kości, hamując jednocześnie jej syntezę (Mountziaris i Mikos 2008).

W przeprowadzonych badaniach zastosowano RG-I niemodyfikowany oraz modyfikowany do pokrycia dwóch rodzajów powierzchni: tytanowej oraz polistyrenowej. Analizy wykonano w oparciu o następujące geny: *IL1B, IL8 i TNFA* – kodujące mediatory reakcji zapalnej oraz *IL10* kodującym cytokinę przeciwzapalną. Badania prowadzono z zastosowaniem neutrofili aktywowanych lipopolisacharydem *Escherichia coli* O26:B6 lub bakteriami *Porphyromonas gingivalis*, a także z użyciem nieaktywowanych komórek.

Generalnie poziom ekspresji *IL1B, IL8* i *TNFA* osiągał niższe wartości dla aktywowanych i nieaktywowanych neutrofili hodowanych na powierzchniach zarówno tytanowych, jak i polistyrenowych pokrytych pektynami. Ze względu na podobieństwo uzyskanych wyników badań, w niniejszym streszczeniu zaprezentowano wyniki ekspresji genów dla neutrofili aktywowanych bakteriami *P. gingivalis* hodowanych na powierzchniach tytanowych (Rys. 5.3.1.). Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi na RG-I niemodyfikowanych oraz modyfikowanym w porównaniu z kontrolą. Najniższe wartości poziomu ekspresji *IL1B, IL8* oraz *TNFA* odnotowano dla komórek rosnących na RG-I modyfikowanym, a najwyższe dla komórek hodowanych na powierzchniach kontrolnych. Poziom ekspresji genu kodującego cytokiny przeciwzapalne IL10 również był niższy w przypadku aktywowanych i nieaktywowanych neutrofili hodowanych na powierzchniach zarówno polistyrenowych, jak i tytanowych pokrytych RG-I w porównaniu do komórek na powierzchniach kontrolnych. Nie zaobserwowano jednak różnic statystycznych.



Rys. 5.3.1. Relatywny (względny) poziom ekspresji genów *TNFA, IL1B, IL8* oraz *IL10* oznaczony w pierwotnych ludzkich neutrofilach hodowanych na powierzchniach tytanowych w 4 godzinie od infekcji.

Wyniki normalizowano względem genu referencyjnego, kodującego β2-mikroglobulinę (B2M). Uzyskany wynik jest średnią z dziewięciu niezależnych doświadczeń ± 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.

Niższy poziom ekspresji genów *IL1B, IL8* oraz *TNFA* dla nieaktywowanych neutrofili hodowanych na powierzchniach pokrytych RG-I wskazuje, iż obecność ramnogalakturonanu-I nie wywołuje reakcji zapalnej. Również w przypadku aktywowanych neutrofili hodowanych na RG-I zaobserwowano obniżenie ekspresji tych genów. Można zatem wnioskować, że zastosowanie ramnogalakturonanu-I może prowadzić do wyciszenia reakcji zapalnej, co sprzyja prawidłowemu przebiegowi procesu osteointegracji. Podobne badania wykonali Gallet i in. (2009). W swojej pracy użyli mysich makrofagów linii komórkowej J774.2, aktywowanych przy użyciu LPS. Wyniki otrzymane przez Gallet i in. (2009) pokazały, że komórki hodowane na powierzchniach polistyrenowych pokrytych pektynami wyizolowanymi z jabłek charakteryzowała niższa zawartość TNFα - czynnika martwicy nowotworu α (ang. *tumour necrosis factor alpha*) wydzielonego do medium w porównaniu z kontrolą.

Wyniki ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne dla komórek aktywowanych LPS pochodzącym z *E. coli* przyjmowały wyższe wartości niż dla komórek stymulowanych bakteriami *P. gingivalis.*

Reasumując, zastosowanie RG-I obniża poziom ekspresji genów kodujących zarówno cytokiny prozapalne i przeciwzapalne w neutrofilach nieaktywowanych oraz stymulowanych LPS *E. coli* O26:B6 lub bakteriami *P. gingivalis*.

5.4. Podsumowanie badań *in vitro*

Przeprowadzone badania wykazały korzystny wpływ obu pektyn na komórki, jednak zaobserwowano, iż modyfikowany RG-I intensywniej oddziałuje na analizowane procesy w odniesieniu do niemodyfikowanego RG-I. W badaniach Gurzawska i in. (2012a) wykazano, iż połączenie powstające pomiędzy łańcuchami bocznymi RG-I a komórkami, może znacząco wpływać na ich zachowanie. Wzmożona odpowiedź komórkowa na pektyny może wynikać z budowy chemicznej polisacharydów i ich zbliżonych właściwości do glikozaminoglikanów (ang. *glycosaminoglycans,* GAGs) występujących naturalnie w macierzy zewnątrzkomórkowej. Pełnią one istotną rolę w regulacji proliferacji i różnicowania się osteoblastów oraz inicjowaniu adhezji (Gurzawska i in. 2012a, Munarin i in., 2011).

6. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej oceniono wpływ ramnogalakturonanu-I na odpowiedź biologiczną wybranych komórek (osteoblastów, fibroblastów oraz neutrofili) uczestniczących w procesie osteointegracji. Realizację badań podjęto w celu określenia, czy RG-I może znaleźć zastosowanie w implantologii stomatologicznej jako biomateriał do pokrywania powierzchni tytanowych implantów śródkostnych.

Wyniki uzyskane w pracy wskazują, że zarówno ramnogalakturonan-I niemodyfikowany, jak i modyfikowany stymuluje odpowiedź biologiczną badanych komórek. Wykonane analizy dowiodły, że niemodyfikowany i modyfikowany RG-I:

a) wpływają na właściwości warstwy wierzchniej poprzez zwiększenie hydrofilności oraz chropowatości;

b) zwiększają proliferację osteoblastów, wydzielanie jonów wapnia tworzących macierz kostną oraz ekspresję genów odpowiedzialnych za proces osteogenezy;

c) wzmagają proliferację fibroblastów, ich aktywność metaboliczną oraz ekspresję genów odpowiedzialnych za przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej;

d) obniżają poziom ekspresji genów kodujących mediatory reakcji zapalnej oraz cytokiny przeciwzapalne produkowanych przez neutrofile.

Ponadto w pracy dowiedziono, iż modyfikowany RG-I o krótszych łańcuchach bocznych arabinozy wywołuje silniejszy efekt niż niemodyfikowany RG-I.

Badania *in vitro* z udziałem wybranych komórek pozwalają uzyskać informacje o potencjalnych możliwościach osteointegracji ramnogalakturonanu-I, mogącego stanowić warstwę wierzchnią implantu śródkostnego, z kością. Uzyskany w badaniach efekt wzmożonej aktywności osteoblastów i fibroblastów, przy jednoczesnym obniżeniu odpowiedzi zapalnej neutrofili, sugeruje dobrą biozgodność RG-I. Ponadto pozwala przypuszczać, że zastosowanie RG-I do modyfikacji powierzchni implantu może znacząco poprawić osteointegrację wszczepu, zapewniając jego trwałe zrośnięcie z kością. Wprowadzenie ramnogalakturonanu-I do użytku na skalę komercyjną wymaga jednak zrealizowania kolejnych etapów testowania materiałów, obejmujących analizy w warunkach *in vivo* oraz badania kliniczne.

7. Literatura

1) Albrektsson T, Brånemark P-I, Hansson H-A, Lindström J. 1981. Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. Acta Orthopaedica Scandinavica. 52(2):155-170.

2) 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.

3) Cankar K, Kortstee A, Toonen MA, Wolters-Arts M, Houbein R, Mariani C, Ulvskov P, Jorgensen B, Schols HA, Visser RG. 2014. Pectic arabinan side chains are essential for pollen cell wall integrity during pollen development. Plant biotechnology journal. 12(4):492-502.

4) Cassatella MA, Gasperini S, Russo MP. 1997. Cytokine expression and release by neutrophilsa. Annals of the New York Academy of Sciences. 832(1):233-242.

5) Gallet M, Vayssade M, Morra M, Verhoef R, Perrone S, Cascardo G, Vigneron P, Schols H, Nagel M-D. 2009. Inhibition of lps-induced proinflammatory responses of j774. 2 macrophages by immobilized enzymatically tailored pectins. Acta biomaterialia. 5(7):2618-2622.

6) 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.

7) Gurzawska K, Svava R, Yihua Y, Haugshøj KB, Dirscherl K, Levery SB, Byg I, Damager I, Nielsen MW, Jørgensen B. 2014. Osteoblastic response to pectin nanocoating on titanium surfaces. Materials Science and Engineering: C. 43:117-125.

8) Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. 2014. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. Frontiers in pharmacology. 5:123.

9) 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.

10) Kokkonen HE, Ilvesaro JM, Morra M, Schols HA, Tuukkanen J. 2007. Effect of modified pectin molecules on the growth of bone cells. Biomacromolecules. 8(2):509-515.

11) Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2− δδct method. methods. 25(4):402-408.

12) Majewski S, Majewski P. 2009. Biologiczne mechanizmy przebudowy struktur kostnych i gojenia tkanek miękkich jamy ustnej po zabiegach implantacyjnych. Implantoprotetyka. 10(1):3-7.

13) 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.

14) Mountziaris PM, Mikos AG. 2008. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. Tissue Engineering Part B: Reviews. 14(2):179-186.

15) Munarin F, Guerreiro SG, Grellier MA, Tanzi MC, Barbosa MA, Petrini P, Granja PL. 2011. Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering. Biomacromolecules. 12(3), 568-577.

16) Neve A, Corrado A, Cantatore FP. 2011. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. Cell and tissue research. 343(2):289-302.

17) Nowacka M. 2012. Biomateriały stosowane w inżynierii komórkowej i medycynie regeneracyjnej. Wiadomości Chemiczne. 66:9-10.

18) Pińkowska H, Złocińska A. 2014. Pektyny–występowanie, budowa chemiczna i właściwości. Wiadomości Chemiczne. 68(7-8):683-700.

19) Rucci N. 2008. Molecular biology of bone remodelling. Clinical cases in mineral and bone metabolism. 5(1):49-56.

20) Stawińska N, Ziętek M, Kochanowska I. 2005. Molekularne procesy resorpcji kości i ich potencjał terapeutyczny w leczeniu chorób przyzębia i osteoporozy. Dental and Medical Problems. 42(4):627-635.

21) Theilgaard-Mönch K, Knudsen S, Follin P, Borregaard N. 2004. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. The Journal of Immunology. 172(12):7684-7693.

22) Witkowska-Zimny M, Wróbel E, Przybylski J. 2009. Najważniejsze czynniki transkrypcyjne procesu osteoblastogenezy. Postępy Biologii Komórki. 36(4):695-705.

23) Zarb GA, Hobkirk J, Eckert S, Jacob R. 2013. Prosthodontic Treatment for Edentulous Patients-E-Book: Complete Dentures and Implant-Supported Prostheses. Elsevier Health Sciences.