

STRESZCZENIE

Choroby kości stanowią istotne wyzwanie zdrowotne o zasięgu globalnym, dotykając osoby w różnym wieku i obu płci. U osób powyżej 50. roku życia odpowiadają za około połowę wszystkich schorzeń przewlekłych. Do najczęstszych należą choroba zwyrodnieniowa stawów i osteoporoza, które dotykają odpowiednio około 7,6% i 2,5% populacji światowej.

Tkanka kostna ulega ciągłej przebudowie dzięki aktywności komórek kostnych, jednak w przypadku złamań patologicznych lub dużych ubytków jej zdolność do regeneracji bywa niewystarczająca. Proces ten dodatkowo utrudniają choroby ogólnoustrojowe, infekcje oraz niedostateczne unaczynienie. Choć przeszczepy autologiczne są uznawane za „złoty standard”, ich stosowanie wiąże się z ograniczeniami, a alternatywne metody nie zawsze zapewniają skuteczną regenerację.

W odpowiedzi na wyzwania współczesnej medycyny regeneracyjnej, w swojej pracy doktorskiej podjęłam się zaprojektowania i wytworzenia koniugatów przeznaczonych do zastosowania jako składniki implantu zastępującego ubytki kostne. Kompozyty te miały pełnić rolę tymczasowej matrycy komórkowej oraz wspomagać regenerację uszkodzonej tkanki.

Celem mojej pracy było opracowanie innowacyjnych materiałów o właściwościach proregeneracyjnych, przeznaczonych do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej. W tym celu zaprojektowałam, zsyntezowałam i scharakteryzowałam trzy typy koniugatów, które składały się z chitozanu, maleimidoaminokwasu oraz wyselekcjonowanych peptydów stanowiących fragmenty czynników wzrostu, różniły się sposobem integracji peptydów z matrycą chitozanową oraz mechanizmem ich uwalniania.

Pierwszy typ koniugatu zawierał chitozan z kowalencyjnie przyłączonym, biologicznie aktywnym peptydem ug4. Do jego sprzężenia z chitozanem zastosowałam łącznik maleimidowy. Drugi typ stanowiła mieszanina chitozanu z wolnym peptydem ug51, który ulegał powolnej autohydrolizie, stopniowo uwalniając aktywne sekwencje do środowiska tkanki kostnej. Trzeci typ koniugatu zawierał chitozan z fibrylami peptydowymi ug52, cechującymi się wysoką stabilnością i kontrolowanym, długotrwałym uwalnianiem peptydów, co czyni je obiecującym materiałem o przedłużonym działaniu terapeutycznym. Zaprojektowane przeze mnie peptydy zawierały dodatkowo sekwencje rozpoznawane przez metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej 7 (MMP-7), co umożliwiało ich enzymatyczne, kontrolowane uwalnianie w warunkach fizjologicznych, bezpośrednio w miejscu implantacji. Stabilność peptydów w wodzie i medium hodowlanym oraz miejsce

degradacji enzymatycznej przez MMP-7 analizowałam za pomocą chromatografii cieczowej i spektrometrii mas.

Badania biologiczne, obejmujące ocenę cytotoksyczności i proliferacji osteoblastów w kontakcie z badanymi związkami, przeprowadziłam we współpracy z Instytutem Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w Gdańsku. Na podstawie wyników biologicznych i analizy ekonomicznej wybrałam peptyd wykazujący najwyższą aktywność, dla którego opracowałam i zoptymalizowałam procedurę syntezy w skali półtechnicznej.

Przeprowadziłam syntezę aktywnego estru maleimidoglicyny oraz opracowałam metodę funkcjonalizacji chitozanu poprzez przyłączenie maleimidoaminokwasu. Stopień podstawienia analizowałam metodą HPLC po uprzedniej optymalizacji warunków chromatograficznych i doborze wzorca zewnętrznego. Na tej podstawie zaprojektowałam i zoptymalizowałam syntezę koniugatu peptyd-chitozan, uzyskanego na drodze kowalencyjnego sprzężenia wybranego peptydu z sfunkcjonalizowanym chitozanem. Skuteczność sprzężenia oceniałam metodą HPLC, uwzględniając walidację warunków analitycznych i dobór wzorca kalibracyjnego.

Uzupełnieniem pracy było otrzymanie fibryli peptydowych o właściwościach proregeneracyjnych oraz ich szczegółowa charakterystyka fizykochemiczna, obejmująca testy agregacyjne, spektroskopię dichroizmu kołowego (CD), barwienie tioflawiną T oraz transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).

Podsumowując, przeprowadziłam optymalizację procesu syntezy peptydów, funkcjonalizację chitozanu oraz analizę fizykochemicznych i biologicznych właściwości otrzymanych koniugatów i struktur fibrylarnych. Opracowane przeze mnie koniugaty miały na celu stworzenie bioaktywnego środowiska wspierającego proces regeneracji tkanki kostnej oraz kontrolowaną prezentację bioaktywnych komponentów. Krążki kompozytowe zostały przygotowane we współpracy z Instytutem Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, Sieć Badawcza Łukasiewicz. Opracowane materiały zostały scharakteryzowane pod kątem właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej. Dla kompozytu wykazującego najlepsze właściwości proregeneracyjne przeprowadzono badania implantacyjne w Centrum Badań Przedklinicznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, oceniające toksyczność ostrą oraz miejscową reakcję tkanki kostnej po wszczepieniu biomateriału. Badania przedstawione w niniejszej dysertacji mają charakter interdyscyplinarny, uzyskane wyniki poszerzają wiedzę światową w zakresie materiałów kompozytowych do wypełnień kości.