

## I. STRESZCZENIE

Utrata tkanek miękkich w rozumieniu społeczno-ekonomicznym stanowi istotny problem medyczny, zwłaszcza że pociąga za sobą utratę kości, a w konsekwencji zębów. Celem uzyskania prawidłowego funkcjonowania narządu żucia jest uzupełnienie deficytu objętościowego tkanki. Dlatego coraz częściej, przed rehabilitacją ortodontyczną, protetyczną, czy implantologiczną wykonywana jest augmentacja dziąsła zrogowaciałego. Zabieg ten zapobiega powstawaniu recesji dziąsłowych, dehiscencji i fenestracji kostnych. Jednocześnie zapewnia cechy profilu tkanki miękkiej, wpływające na estetykę czerwono-białą. Spośród materiałów stosowanych do augmentacji w dalszym ciągu złotym standardem jest autogenna tkanka łączna. Jednak towarzyszące im ograniczenia ilościowo-jakościowe oraz podwójne pole zabiegowe, stały się asumptem do poszukiwania substytutów tkanki łącznej. Rola tkanki łącznej w rógowaceniu nabłonka, zainspirowała badaczy, do poszukiwania typu komórek, sposobu ich izolowania i hodowania, które samodzielnie lub na nośnikach mogłyby regenerować utracone tkanki. Tymi komórkami są fibroblasty.

Cechą fibroblastów dziąsła jest niewątpliwie ich potencjał regeneracyjny. Dzięki zdolności uwalniania czynników wzrostu, cytokin, regulują rozwój tkanki, wpływając na organogenezę, homeostazę, angiogenezę, remodeling macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), a w konsekwencji bezbliznowe gojenie rany.

Dotychczasowe osiągnięcia z zakresu biomimetyki, fotobiomodulacji oraz potrzeby kliniczne skłaniają do poszukiwania pośrednich metod, wykorzystujących naturalne składniki, zważając na efektywność zabiegu, ale coraz częściej na atraumatyczność i estetykę.

Celem pracy była optymalizacja i ocena metod proliferacji fibroblastów dziąsła zrogowaciałego z zastosowaniem nośników żelowych, fibryny bogatopłytkowej oraz fotobiostymulacji laserowej w kontekście augmentacji dziąsła zrogowaciałego.

Podstawą niniejszej dysertacji są 4 artykuły, tematycznie spójne, opublikowane w czasopismach naukowych o łącznym IF= 10,266.

Wyniki badań klinicznych opublikowane w pierwszej pracy, zaliczonej do powyższej dysertacji, stały się podstawą poszukiwania nowych efektywniejszych stymulatorów podstawowych komórek tkanki łącznej. W związku z tym podjęto próby oceny wpływu nośnika żelowego, procedury fotobiostymulacji (PBM) oraz matrycy fibrynowej A-PRF+ na

proliferację fibroblastów. Wszystkie badania zostały przeprowadzone na pierwotnych kulturach komórkowych ludzkich fibroblastów dziąsła, pobranych od dawców.

Zastosowanie nośnika w postaci żelu było podyktowane jego składem i właściwościami. Weryfikowany żel znacząco stymuluje proliferację fibroblastów, a ich aktywność mitochondrialna wzrosła dwukrotnie. Ekspozycja żelu na izolowane komórki wykazała wysokie powinowactwo do żelu oraz zwiększoną ekspresję kolagenu III.

W celu oceny wpływu fotobiomodulacji na fibroblasty zastosowano trzy różne typy lasera: Nd:YAG (1064 nm), laser diodowy (980 nm) oraz prototyp lasera ledowego emitującego długości fali 405, 450 i 635 nm. Gęstość energii wynosiła 3 J/cm<sup>2</sup>, 25 J/cm<sup>2</sup>, 64 J/cm<sup>2</sup>. Najwyższy odsetek aktywność mitochondrialnej (MA) zaobserwowano w grupie naświetlanej laserem 635 nm, o gęstości energii 64 J/cm<sup>2</sup> po 48 godzinach oraz w grupie o długości fali 405 nm o gęstości energii 25 J/cm<sup>2</sup> po 24 godzinach. Zastosowanie napromieniowanie 635 nm i 405 nm spowodowało statystycznie istotny wzrost proliferacji fibroblastów izolowanych z dziąsła.

Proces regeneracji tkanek miękkich to kaskada reakcji sygnalizacyjnych z udziałem układu odpornościowego, płytek krwi i składników tkanki łącznej, w tym fibroblastów. Dlatego w kolejnej pracy wykorzystano bioaktywną membranę w postaci A-PRF+ wzbogaconą wyhodowanymi autogennymi fibroblastami i zbadano wpływ powstałego preparatu na proliferację fibroblastów. Oceniono także ilościowo uwalniane czynniki wzrostu, ekspresję kolagenu III oraz stopień gojenia rany w warunkach in vitro. W badaniu wykazano znaczny wzrost proliferacji fibroblastów, ekspresję kolagenu III i uwalnianie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) i transformującego czynnika wzrostu (TGFβ<sub>2</sub>), po ekspozycji na matrycę A-PRF+ wzbogaconą fibroblastami w odniesieniu do samej matrycy A-PRF+ lub samych fibroblastów w pożywce hodowlanej.

Zweryfikowane metody proliferacji fibroblastów dziąsła zrogowaciałego wskazują na efektywną alternatywę w sytuacji, gdy względy anatomiczne, histologiczne, obciążenie zdrowotne pacjenta lub etyczno-religijne nie pozwalają na przeprowadzenie rekonstrukcji tkanki miękkiej z zastosowaniem obecnie dostępnych materiałów i metod.

## **ABSTRAKT**

In socio-economic terms, the loss of soft tissue is a significant medical problem, mainly because it entails bone loss and, consequently, teeth. The aim of obtaining the proper functioning of the masticatory organ is to supplement the tissue volume deficit. Therefore, more and more often, keratinized gingiva augmentation is performed before orthodontic, prosthetic, or implantological rehabilitation. This treatment prevents the occurrence of gingival recessions, dehiscence, and bone fenestration. At the same time, it provides the features of the soft tissue profile, affecting the red and white aesthetics. Autogenous connective tissue remains the gold standard among the materials used for augmentation. However, the accompanying quantitative and qualitative limitations and a double treatment area have prompted the search for substitutes for connective tissue. The role of connective tissue in the epithelium keratinization inspired researchers to search for the type of cells and how to isolate and cultivate them, which could regenerate lost tissues on their own or carriers. These cells are fibroblasts.

A feature of gingival fibroblasts is undoubtedly their regenerative potential. Due to the ability to release growth factors, cytokines regulate tissue development, influencing organogenesis, homeostasis, angiogenesis, remodeling of the extracellular matrix (ECM), and, consequently, scar-free wound healing.

using gel carriers, platelet-rich fibrin, and the laser photobiostimulation in the context of keratinized gingiva augmentation.

This dissertation is based on four articles, thematically consistent, published in scientific journals with a total IF = 10.266

The results of clinical trials published in the first work, included in the above dissertation, became the basis for searching for new, more effective stimulators of basic connective tissue cells. Therefore, attempts were made to evaluate the effect of gel carrier, the photobiostimulation (PBM) procedure, and the A-PRF + fibrin matrix on the proliferation of fibroblasts. All studies were performed on primary cell cultures of human gingival fibroblasts collected from donors.

The use of gel carrier was dictated by its composition and properties. The verified gel significantly stimulates the proliferation of fibroblasts, and their mitochondrial activity increased twice. Exposure of gel to the isolated cells showed high affinity for the gel and increased expression of collagen III. The current achievements in biomimetics,

photobiomodulation, and clinical needs lead to the search for indirect methods, using natural ingredients, taking into account the effectiveness of the treatment, but more and more often atraumatic and aesthetic.

The study aimed to optimize and evaluate the proliferation methods of keratinized gingival fibroblasts

Due to determining the impact of photobiomodulation on fibroblasts, three different types of laser were used: Nd: YAG (1064 nm), diode laser (980 nm), and a prototype of a LED laser emitting wavelengths of 405, 450, and 635 nm. The energy density was 3 J/cm<sup>2</sup>, 25 J/cm<sup>2</sup>, 64 J/cm<sup>2</sup>. The highest percentage of mitochondrial activity (MA) was observed in the group irradiated with a 635 nm laser with an energy density of 64 J / cm<sup>2</sup> after 48 hours and in the group with a wavelength of 405 nm with an energy density of 25 J/cm<sup>2</sup> after 24 hours. The use of 635 nm and 405 nm irradiation caused a statistically significant increase in the proliferation of fibroblasts isolated from the gingiva.

The soft tissue regeneration process is a cascade of signaling reactions involving the immune system, platelets, and connective tissue components, including fibroblasts. Therefore, another study used a bioactive membrane in the form of A-PRF + enriched with cultured autogenous fibroblasts. The effect of the resulting preparation on the proliferation of fibroblasts was examined. This biostructure was also quantified in terms of the released growth factors, collagen III expression, and the degree of wound healing in vitro. The study showed a significant increase in fibroblast proliferation, collagen III expression, and the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor (TGF β<sub>2</sub>) when exposed to the A-PRF + matrix enriched with fibroblasts concerning A-PRF + matrix alone or fibroblasts alone in the culture medium.

The verified methods of keratinized gingival fibroblast proliferation revealed an effective alternative where anatomical, histological, patient's health burden or ethical and religious reasons do not allow for the reconstruction of soft tissue using currently available materials and methods.