

Tanninsyre og probiotika kan gi bedre vilkår for titanimplantater

Overflatebehandling av titanimplantater med tanninsyre og probiotikabakterier fremmer både integrering i kjevebeinet og forhindrer bakterieangrep i munnen. Det kan bedre vilkårene for et vellykket resultat ved innsetting av titanimplantat.

 KARI ØVERBY, DET ODONTOLOGISKE FAKULTET, UNIVERSITETET I OSLO

Agnes Rogala er mikrobiolog og i doktorgradsprosjektet sitt har hun kombinert fagområdene biomaterialer, cellebiologi og mikrobiologi.

– Vi hadde to mål med dette prosjektet.

Det første var å bedre festemulighetene for celler og integreringen med vevet i munnhulen. Det andre var å forhindre bakterieinfeksjon. Vi studerte hvordan modifisere titanimplantater for å bedre integreringen med vevet i munnen. Overflaten av tanimplantatet dekket vi med tanninsyre, som er et polyfenol som blant annet finnes i te, sjokolade, kaffe og blåbær, og som er et naturlig middel. Stoffet har antibakterielle og antioksidante egenskaper. Bakterieinfeksjoner er den vanligste formen for komplikasjoner etter å ha fått satt inn implantat i munnen, og det vil vi unngå.

Tanninsyre endret cellenes festevev

Studien undersøkte hvordan celler i tannkjøttet og i kjevebeinet festet seg til overflaten på et tanimplantat av titan. Samtidig besto oppgaven i å sjekke om bakterier også festet seg til den modifiserte overflaten. I det første steget av studien undersøkte man hvordan proteinene fra blod festet seg til overflaten. Det første som skjer når man setter et implantat inn i munnhulen, er at det kommer i kontakt med

ulike proteiner fra spytt og blod. Å teste hvordan disse proteinene fester seg til en tanninsyrebehandlet overflate var vesentlig. Et av funnene var at denne tilførselen er annerledes enn ved en ubehandlet implantatoverflate. Overflaten var endret, og cellenes festevev var også endret.

– Vi hadde en hypotese om at overflatebehandling med tanninsyre ville bedre cellenes festevev, men det vi hadde forventet skjedde ikke. Cellene ville ikke feste seg i det hele tatt på dette proteinlaget. Uten proteinlaget hadde de festet seg perfekt, og trivdes på overflaten.

Nødvendig med ytterligere overflatemodifikasjon

Det er alltid proteiner på overflaten av tanimplantater før cellene slipper til. I det videre arbeidet med studien ville Rogala endre overflatebehandlingen med tanninsyre ytterligere for å øke sjansene for et mer ønsket utfall. Tanninsyre er et molekyl som har god reaksjonsevne med andre stoffer som proteiner, sakkarider og metallioner.

– Vi visste at patogene bakterier fester seg godt til tanninsyrebehandlede overflater. Derfor ville vi legge et annet materiale oppå, som reduserte de dårlige egenskapene til tanninsyre. Men som samtidig bedret cellenes festevev, og reduserte bakterienes festevev.

Vi dekket titanimplantatets overflate med tanninsyre som tidligere, og tilførte samtidig probiotiske bakterier på

det øverst laget. Probiotiske bakterier er bra, så vi ville ha et tett lag. Det er gode bakterier, som du kan finne nesten over alt, for eksempel i munnen, i tarmen og i urinveiene. Vi valgte en streng som kan feste seg til ulike overflater og danne biofilm.

– Selv om de er bakterier, kan de fortsatt produsere antibakterielle virkestoffer som dreper andre sykdoms-fremkallende bakterier, forteller Rogala.

Cellene produserte beinkrystaller

De tanninsyremodifiserte overflatene ble dekket med probiotikabakterien *Lactobacillus crispatus*. Men probiotikaen på overflaten kan ikke være levende når implantatet settes inn, så cellene måtte inaktiveres («drepes»). Et veldig fint lag med probiotika ble inaktivert. For selv i sin inaktive form har probiotika fortsatt fordelaktige og helsefremmende egenskaper.

Deretter testet Rogala overflatene med celler, for å se hvordan de interagerer med overflaten og med patogene bakterier. Videre testet hun hvordan cellene festet seg til og oppførte seg på overflatene, og om disse overflatene var i stand til å forhindre patogene bakterier i å feste seg.

– Vi fikk lovende resultater. Cellene trivdes veldig godt på overflatene. Vi observerte at de festet seg, vokste, og formerte seg. Cellene ble også mineralisert. Det er det vi ønsker når vi legger implantater i bein. Vi vil ha celler som produserer beinkrystaller og som integreres med bein. De gjorde det på de probiotisk dekkede overflatene, og det var bra.

Test med sykdomsfremkallende bakterier

Det var også nødvendig å teste om overflatene hadde antimikrobielle egenskaper. Den patogene bakterien *Staphylococcus epidermidis* ble brukt til dette formålet.

– Det er en bakterie vi har på huden, men når en pasient med nedsatt immunforsvar får satt inn et implantat, har vi en situasjon der immunresponsen ikke fungerer så godt i forbindelse med en skade. I slike tilfeller kan denne bakterien forårsake betennelse, sier Rogala.

Den patogene bakterien ble tilsatt på overflaten der det var et tynt lag av probiotika, så de dårlige bakteriene fremdeles kunne feste seg og kolonisere overflaten. Med veldig tykke, fine lag med probiotika, kunne ikke de patogene bakteriene feste seg. De forhindret dermed infeksjonen i å utvikle seg.

– Dette er en ganske ny metode. Så langt har jeg bare kunnet finne tre studier om probiotisk overflatemodifise-



Agnes Rogala med te, blåbær, granateple og sjokolade som alle inneholder tanninsyre. Foto: Marie Lindeman Johansen, OD/UIO

ring, og den første artikkelen ble gitt ut i 2018. Tilnærmingen er ganske ny, spesielt med probiotika, og den har gitt veldig lovende resultater, forteller Rogala.

Metoder og teknikker

Teknikkene studien brukte er ganske kompliserte. Maskinen QCM-D er en forkortelse for Quartz Crystal Microbalance with Dissipation. Veldig enkelt sagt, kan man med denne metoden eksempelvis overvåke implantatoverflaten når man injiserer tanninsyreløsning i sanntid: Hvor raskt molekylene adsorberer på overflaten, og hvor tykt laget av tanninsyre blir. Den samme monitoreringen ble gjort med proteiner når de ble injisert på implantatoverflaten. Med QCM-D kunne man overvåke hvor raskt proteinene ble adsorbent, og hvor tykt proteinlaget var.

Ved å bruke denne metoden kan man også registrere i sanntid hvordan cellene fester seg til overflaten. Med QCM-D-metoden får man egentlig bare tall som man lager en kurve ut fra. Formen på kurven gir oss informasjon om laget som har dannet seg på overflaten. Studien observerte at celler responderte annerledes på tanninsyrelaget enn til en overflate som ikke var dekket med tanninsyre, men de visste ikke hva cellene faktisk gjør. Hvordan oppfører de seg på overflaten?

Rogalas prosjekt kombinerte QCM-D-metoden med konfokalmikroskopi. Sistnevnte gjør det mulig å lage optiske snitt med høy oppløsning og kontrast. Denne teknikken gjør det mulig å rekonstruere tre-dimensjonale strukturer med høy detaljrikdom.

QCM-D og konfokalmikroskopi

Agnes Rogala forteller at det ble laget en video av hva cellene gjør på overflaten.

Prosjektet kombinerte QCM-D med bilder av levende celler. Det innebærer at man farger de humane cellene når man ser dem på overflaten og tar bilder hvert 15. minutt, for å se om de fester og sprer seg på overflaten. Målet var å se om cellene var levende når eksperimentet ble gjennomført eller ikke.

– Vi så forskjeller i hvordan cellene oppførte seg på overflater dekket med tanninsyre og overflater som ikke var dekket. Når vi eksempelvis hadde mange proteiner på en overflate som var dekket med tanninsyre, kunne ikke cellene feste seg i det hele tatt. De bare beveget seg frem og tilbake, og kunne ikke spre seg. Når vi hadde dekket overflaten med tanninsyre uten proteiner, spredte imidlertid cellene seg så fort vi injiserte dem. Tanninsyre oppfører seg som lim, men når vi tilsetter et proteinlag på tanninsyre, så oppfører cellene seg som om de er forvirret, og ikke vet hva de skal gjøre. Da observerte vi også litt høyere dødstill blant cellene, sier Agnes.

– Vi farget også cellene ved at vi inaktiverte og på en måte «drepte» cellene på implantatoverflaten. Ved å farge cellene kan man se hvordan cellene ser ut. Om de sprer seg fint og hvilken form de har.

I neste steg brukte Rogala en annen metode som heter ELISA for å beskrive celleprosessene i prosjektet. Denne metoden brukes for å kvantifisere proteinene i cellene.

– Vi brukte denne metoden, for å beskrive hvordan humane celler sprer seg. ELISA brukes til å overvåke mange ulike prosesser i cellene, ikke kun spredning.

De danner tynne utløpere som ligner fingre eller en hånd, såkalte filopodier. I enden av hver filopodi danner cellen små adhesjonsstrukturer som fester seg til underlaget, men ikke overalt – bare på utvalgte punkter.

Så vi ville kvantifisere en av proteinene i filopodia, for å se hvor sterkt de knytter seg til overflaten. Og vi så at det på tanninsyredekket overflate var mindre av dette proteinet enn på udekket titanoverflate. Det betyr at tanninsyre er et slags forstyrrelsesmiddel.

UV-lys inaktiverer bakteriene

Celleeksperimentene er gjort på forskningslaben ved Institutt for klinisk odontologi. For å undersøke bakterienes påvirkning på titanoverflatene jobbet Agnes Rogala i Fernanda Petersens lab ved Institutt for oral biologi (IOB). Der fikk hun tilgang til både probiotiske og patogene bakterier. Prøvene med dekkede titanoverflater hadde Rogala forberedt på forhånd, for det er ikke lov til å jobbe med bakterier på forskningslaben.

– Vi inaktiverte eller «drepte» cellene med UV-lys, så de ikke var «levende» lenger.

Det samme ble gjort med bakteriene, fordi vi ikke ønsket å få immunrespons på probiotika på implantater. Vi inaktiverte altså bakteriene, før jeg tok titanflatene med meg tilbake til forskningslaben. Der så jeg på cellene og utførte eksperimenter på hvordan cellene reagerte på overflatene dekket med de ulike lagene.

Eksperimentet med å teste for antibakterielle aktiviteter mot bakteriene gjorde jeg ved IOB. Jeg utførte så de samme eksperimentene som jeg hadde gjort med cellene. Vi påførte et lag med probiotiske bakterier, og inaktiverte bakteriene med UV-lys. Og så la vi på patogene bakterier, og vi undersøkte om de festet seg til overflaten eller ikke.

– Hvorfor er denne forskningen viktig?

– Dette er viktig fordi forskere på biomaterialer tester mange ulike overflatemodifiseringer. Med prosjektet mitt ville vi kombinere og lage et multifunksjonelt belegg som både fremmer integrering og forhindrer bakterieangrep. Vanligvis er disse variantene monofunksjonelle. Det betyr at de enten bedrer integrasjonen med implantater, bygger vev, eller de forhindrer bakterieinfeksjon. De bidrar ikke til denne todelte aktiviteten. Basert på faglitteraturen kan tanninsyre gjøre begge deler. Vi fikk lovende resultater. Jeg tror ikke tanninsyre som overflatemodifisering fungerer som antibakterielt middel ennå. Det er en hypotese, som må modifiseres ytterligere, og det er i så fall et annet PhD-prosjekt, avslutter Agnes Rogala.

REFERANSER

1. Rogala, Agnes; Tiainen, Hanna & Zaytseva-Zotova, Daria (2024). Using QCM-D for Real-Time Analysis of Cell Adhesion Dynamics at Biointerfaces. *Advanced Materials Interfaces*. ISSN 2196-7350. doi: 10.1002/admi.202400811.
2. Rogala, Agnes; Zaytseva-Zotova, Daria; Oreja Remartinez, Enrique; Barrantes Bautista, Alejandro & Tiainen, Hanna (2024). Combining QCM-D with live-cell imaging reveals the impact of serum proteins on the dynamics of fibroblast adhesion on tannic acid-functionalised surfaces. *Biomaterials Science*. ISSN 2047-4830. 12, s. 3345–3359. doi: 10.1039/d4bm00184b.