

## 2. Abstract

---

This doctoral dissertation entitled "Modifications of the inflammatory response in disorders of musculoskeletal system in animals" is a cycle of four thematically related original research papers [P1–P4]. It covers issues connected with the modification of the inflammatory response in disorders of the musculoskeletal system. In the light of fact that neutrophils and their products play a significant role in the healing process particular attention was focused on these cells. Excessive release of proteases, contributes to tissue and organ damage, on the other hand some substances among others antimicrobial peptides and proteins show potent anti-inflammatory activity and stimulate tissue repair. Therefore, there is an increasing interest in potential modifiers of inflammatory response during healing process. Prolonged or excessive activation of the immune system may lead to tissue and organ damage, and during implantation of biomaterial can lead to implant rejection. Therefore the primary aim of the research was to precise analyze the mechanisms involved in the course of these responses.

The first stage of conducted research was estimation of the relation between activity of circulating neutrophils and OA in animals, using saddle horses where acute and chronic lameness is a significant clinical problem.

Due to significant role of excessively activated neutrophils in the course of inflammatory diseases of the musculoskeletal system in horses, it was decided to investigate all biological functions of these cells in order to develop new methods enabling modulation of the inflammatory response. In the first stage of the research in these animals, the correlation between the activity of circulating neutrophils and the lameness degree in the course of various kinds of osteoarthritis (OA): acute (AL) and chronic (CL) was determined. These studies are an introduction to the development of new therapeutic strategy in the treatment of this degenerative disorder.

The next stage of the research conducted on two animal models: sheep and rabbits, was the assessment of the possibility of modifying the inflammatory response in the course of disorders of the musculoskeletal system using blood-derived products: neutrophil antimicrobial extract (ANE), neutrophil degranulation products (DGP) and microvesicles (MVs). This evaluation was made by examining the activity of neutrophils and monocyte-derived macrophages (MDMs) after their earlier stimulation with the above mentioned auto- and heterologous products. Particular attention was paid to examining the influence of ANE on cells isolated during the implantation of the biomaterial into the bones. The aim of the

study was to determine the effect of neutrophil derived products on the modification of the phenotype of neutrophils and macrophages into the pro- or anti-inflammatory subtype during disorders of the musculoskeletal system. Knowing that ovine ANE could have a potential cytotoxic effect on mammalian cells, this study further assessed this aspect.

In the course of the conducted research, long-term interactions between circulating neutrophils and biomaterial up to 10 months after implantation of a titanium (Ti) implant in sheep were also analyzed. In this study the assessment of the interaction between blood-derived products (especially platelet-derived products) and neutrophils and the ways of possible modulation of these responses were evaluated.

The obtained results show that blood-derived products can influence the inflammatory response in the course of musculoskeletal system injuries. Moreover, it has been proven that the discussed neutrophil-derived products: ANE, MVs, DGP and some platelet-derived products, i.e. platelet-rich plasma (L-PRP), platelet-poor plasma (PPP) and PURE-PRP, can modify macrophages into a pro-inflammatory or anti-inflammatory subtype. There was neither evidence of a deleterious effect of neutrophils at the implant site nor systemic inflammatory response after prolonged contact with Ti implant. These findings could be useful for the development of new strategies and alternative solutions for the treatment of many musculoskeletal dysfunctions.

**Keywords:**

*Antimicrobial peptides, tissue repair, neutrophils, macrophages, musculoskeletal system disorders, titanium implants, inflammation*



### 3. Streszczenie

---

Niniejsza rozprawa doktorska pt. „Modyfikacje odpowiedzi zapalnej w przebiegu zaburzeń układu mięśniowo-szkieletowego u zwierząt” stanowi cykl czterech spójnie powiązanych tematycznie oryginalnych prac badawczych [P1–P4]. Obejmuje ona zagadnienia związane z modyfikacją odpowiedzi zapalnej organizmu w przebiegu zaburzeń układu mięśniowo-szkieletowego. Z uwagi na fakt, że kluczową rolę w procesach gojenia odgrywiają neutrofile, które ze względu na zawarte w nich aktywne czynniki mogą działać dwojako, w pracy tej szczególną uwagę poświęcono właśnie tym komórkom. Za pośrednictwem uwalnianych proteaz przyczyniają się do pogłębiania uszkodzeń, natomiast dzięki obecności niektórych substancji, m.in. peptydów przeciwdrobnoustrojowych wykazują aktywność przeciwzapalną i stymulują procesy gojenia. Z tego powodu duże zainteresowanie jako potencjalne środki terapeutyczne wzbudzają obecnie preparaty, które mogą modyfikować komórkową odpowiedź w przebiegu zapalenia w kierunku wspomaganie procesu gojenia. Z uwagi na to, że przedłużająca się lub nadmierna aktywacja układu immunologicznego może doprowadzić do pogłębienia uszkodzenia tkanek czy nawet odrzucenia implantu stosowanego w terapii wielu zaburzeń ortopedycznych, celem badań była dokładna analiza mechanizmów zaangażowanych w przebieg tych odpowiedzi.

Pierwszym etapem przeprowadzonych badań było potwierdzenie związku aktywacji krążących neutrofilów z występowaniem OA u zwierząt na przykładzie koni wierzchowych, gdzie ostre i przewlekłe kulawizny stanowią istotny problem kliniczny.

Dzięki udowodnionej, znacznej roli nadmiernie aktywowanych neutrofilów u koni w przebiegu chorób układu mięśniowo-szkieletowego o podłożu zapalnym postanowiono zbadać wszelkie biologiczne funkcje tych komórek celem opracowania nowych metod umożliwiających modulację odpowiedzi zapalnej. U zwierząt tych określano korelację pomiędzy aktywnością krążących neutrofilów a stopniem kulawizny w przebiegu różnych wariantów osteoarthritis (OA): ostrego (AL) i przewlekłego (CL). Badania te stanowią wstęp do opracowania nowych rozwiązań terapeutycznych w leczeniu tego zwyrodnienia.

Kolejnym etapem badań przeprowadzonym na dwóch modelach zwierzęcych: owcach i królikach była ocena możliwości modyfikacji odpowiedzi zapalnej w przebiegu zaburzeń układu mięśniowo-szkieletowego za pomocą preparatów krwiopochodnych: neutrofilowego ekstraktu przeciwdrobnoustrojowego (ANE), produktu degranulacji neutrofilów (DGP) oraz mikropęcherzyków błonowych (MVs). Oceny tej dokonywano poprzez badanie aktywności

neutrofile i makrofagi pochodzenia monocytowego (MDMs) po ich uprzedniej stymulacji za pomocą wyżej wymienionych auto- i heterogennych produktów. Szczególną uwagę zwrócono na zbadanie wpływu ANE na komórki wyizolowane w trakcie implantacji biomateriału do ubytku kostnego. Celem pracy było określenie wpływu produktów pochodzenia neutrofilowego na modyfikację fenotypu neutrofile i makrofagi w podtyp pro- lub przeciwzapalny podczas zaburzeń układu mięśniowo-szkieletowego. Wiedząc, że owczy ANE może mieć potencjalny wpływ cytotoksyczny na komórki ssaków w badaniu tym dodatkowo oceniano ten aspekt.

W toku realizowanych badań analizowano również długoterminowe interakcje pomiędzy krążącymi neutrofilami a biomateriałem w przebiegu urazów kostnych do 10 miesięcy po wykonaniu wszczepienia implantu tytanowego u owiec. Badanie to wzbogacono również o ocenę interakcji pomiędzy produktami krwiopochodnymi (zwłaszcza płytkopochodnymi) a neutrofilami oraz możliwe modulacje tych odpowiedzi.

Uzyskane wyniki pokazują, że produkty krwiopochodne mogą mieć wpływ na modulację komórkowej odpowiedzi zapalnej w przebiegu urazów mięśniowo-szkieletowych. Ponadto udowodniono, że omawiane preparaty krwiopochodne: ANE, MVs oraz DGP, a także niektóre produkty pochodzenia płytkowego tj. osocze bogatopłytkowe (L-PRP), osocze ubogopłytkowe (PPP) oraz PURE-PRP mogą modyfikować makrofagi w podtyp pro- lub przeciwzapalny. Nie stwierdzono potencjalnego, szkodliwego oddziaływania neutrofile w miejscu urazu oraz nasilenia ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej w wyniku ich długotrwałego kontaktu z implantem tytanowym. Odkrycia te mogą być przydatne do opracowania nowego typu strategii i alternatywnych rozwiązań w terapii wielu dysfunkcji układu mięśniowo-szkieletowego.

**Słowa kluczowe:**

*Peptydy przeciwdrobnoustrojowe, naprawa tkanek, neutrofile, makrofagi, zaburzenia układu mięśniowo-szkieletowego, implanty tytanowe, zapalenie*