

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2021 508**
(22) Paraiškos padavimo data: **2021-03-12**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2022-09-26**

(71) Pareiškėjas:
**VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Žalgirio klinika,
Žalgirio g. 117, 08217 Vilnius, LT**

(72) Išradėjas:
**Alina PŪRIENĖ, LT
Sonata JARMALAITĖ, LT
Irena BUTRIMIENĖ, LT
Eglė PUNCEVIČIENĖ, LT
Kristina ŠNIPAITIENĖ, LT
Adomas ROVAS, LT**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
**Jurga PETNIŪNAITĖ, 51, AAA Law, A. Goštauto g.
40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

Mikro-RNR kompozicija skirta dantų implantams

(57) Referatas:

Titaninis dantų implantas, sujungtas su pasirinktų miR-140-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p ir miR-195-5p inhibitorių deriniu yra medicinos sričiai skirtas išradimas. Veikiant minėtiems miRNR inhibitoriams, pagreitinėja danties implanto integracija į kaulą, taip mažėjant jo atmetimo tikimybei bei sisteminių antibakterinių vaistų poreikiui. Be to, dėl efektyvesnės osteointegracijos šie dantų implantai gali būti naudojami asmenims, turintiems polinkį sirgti diabetu, osteoporoze, reumatoidiniu artritu ar skydliaukės disfunkcija.

MIKRO-RNR KOMPOZICIJA SKIRTA DANTŲ IMPLANTAMS

TECHNIKOS SRITIS

Išradimas skirtas medicinos sričiai, o konkrečiai tai yra titaninis dantų implantas funkcionalizuotas mikro-RNR (miRNR) inhibitoriais, siekiant slopinti uždegimą apie implantą esančiuose audiniuose ir tokiu būdu padidinti implanto prigijimo tikimybę, sumažinti implanto integracijos kaule laiką bei sumažinti papildomų antibakterinių sisteminių preparatų poreikį.

TECHNIKOS LYGIS

Uždegimas yra kompleksinis patofiziologinis imuninių komponentų atsakas į žalingą veiksnį, siejamas su daugeliu ligų. Uždegimo metu prie ląstelių membranose esančių patogenų atpažinimo receptorių (angl. *pattern recognition receptor*, PRR) jungiasi patogeninės (bakterijų lipopolisacharidai, išorinės membranos vezikulės, fibrijos ir kt.) arba endogeninės kilmės molekulės (įvairūs viduląsteliniai baltymai, aminorūgštys, fosfolipidai ir kt.) (1). Ligando sąveika su PRR aktyvina signalo perdavimo kelius, kurie reguliuoja skirtingus transkripcinius ir potranskripcinius procesus. Branduolio veiksnys kapa B (angl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*, NF-κB) priklauso indukuojamųjų transkripcijos veiksnių šeimai, kurie neretai vadinami pagrindiniais žmogaus uždegimo mediatoriais (2). Uždegimo metu citoplazmoje esantys neaktyvūs NF-κB baltymai atsijungia nuo slopinančių baltymų ir, patekę į ląstelių branduolį, prisijungia prie specifinės DNR srities bei paskatina genų taikinių transkripciją. Tai lemia uždegiminių citokinių (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α), chemokinių (MCP-1, IL-18, RANTES, MP-2, CXCL1, CXCL10), anti-apoptozinių veiksnių, adhezijos molekulių produkciją (3). TNF-α, IL-1β, MCP-1 bei kitų uždegiminių citokinių ir chemokinių kiekio padidėjimas lemia imuninių ląstelių migraciją į pažeidimo vietą, imuninių ląstelių diferenciaciją bei uždegimo skatinimą. Tiek uždegime dalyvaujančių mediatorių, įskaitant NF-κB, uždegiminių citokinių, chemokinių, PRR, tiek ir imuninių ląstelių veikla yra nuolatos reguliuojama molekulių tarpusavio teigiamaisiais ir neigiamaisiais grįžtamaisiais ryšiais, o uždegimo mediatorių kiekis turi įtakos viso organizmo homeostazei. Daugelis ligų, ypač autoimuninės ir lėtinės uždegiminės ligos, siejamos su uždegimo mediatorių disbalansu ir neefektyviu mažo intensyvumo lėtiniu uždegimu (4). Išbalansuoto uždegiminio elemento identifikavimas ir jo aktyvumo korekcija yra viena efektyviausių uždegiminių ligų gydymo strategijų. Pavyzdžiui, autoimuninių ligų (reumatoidinio artrito, ankilozinio spondilito ir kt.) gydymui taikoma terapija monokloniniais antikūniais, besijungiančiais specifiskai su TNF-α ir efektyviai slopinančiais uždegimą (5). Visgi, nepaisant teigiamų gydymo rezultatų, platų vaisto pritaikymą kasdieninėje praktikoje riboja šalutinių reakcijų dažnis ir itin dideli vaistų gamybos kaštai (6).

Viena daugiausiai žadančių terapinių alternatyvų šiuo metu naudojamiems vaistiniams preparatams – epigenetinis genų raiškos reguliavimas. Epigenetika nagrinėja paveldimus genų funkcijos pokyčius, nesusijusius su DNR sekos pokyčiais. Vienas iš epigenetinių reguliavimo mechanizmų yra miRNR. MiRNR yra nekoduojančių, viengrandžių RNR klasė. Subrendusi miRNR vidutiniškai yra 22 nukleotidų ilgio bei iki 10 nm³ dydžio. Šiuo metu duomenų bazėse užregistruota maždaug 2500 miRNR, iš kurių validuota virš 1100 miRNR (7). MiRNR daugiausia neigiamai veikia genus taikinius, slopindama tolesnę specifinių informacinių RNR transliaciją bei baltymų sintezę. MiRNR reguliuoja apie 30 % baltymus koduojančių genų veiklą bei tokiu būdu prisideda prie daugelio fiziologinių ir patologinių procesų (8). MiRNR trūkumas arba perteklius yra susijęs su atitinkamų baltymų sintezės pokyčiais, dėl to miRNR itin plačiai tiriamos įvairių būklių diagnostikai. Tuo tarpu naudojant sintetines miRNR (angl. *mimic*) arba miRNR antagonistus (miRNR inhibitorius) galima koreguoti endogeninių miRNR koncentraciją, kuri lemia pakitusią tikslinių baltymų sintezę. Itin mažas miRNR molekulės dydis, mažas sisteminis toksiškumas ir nepageidautinų reakcijų skaičius, nedideli gamybos kaštai bei didelis potencialas moduluoti organizmo homeostazę yra susijęs su tuo, kad miRNR laikoma itin perspektyviu terapiniu preparatu įvairiems vėžiniams susirgimams, autoimuninėms ligoms ir lėtinėms uždegiminėms būklėms gydyti.

Viena labiausiai paplitusių lėtinių uždegiminių ligų yra periodontitas. Tai infekcinė liga, apibūdinama jungiamojo audinio uždegimine destrukcija, dėl kurios netenkama periodonto jungties ir rezorbuojasi alveolinis kaulas. Periodontito dažnis gali siekti 10–70 % populiacijos ir didėja proporcingai gyventojų amžiui – nustatyta, kad 70 % vyresnių nei 65 metų gyventojų serga periodontitu (9,10). Periodontitas patogenetiškai beveik identiškas uždegimui apie dantų implantą, vadinamą periimplantitu (11). Periimplantito paplitimas taip pat itin didelis – nustatomas 10–20 % asmenų turinčių dantų implantus (12). Periodontito ir periimplantito atveju aplinkinių audinių destrukcija vyksta dėl uždegiminės osteoklastų aktyvacijos. Osteoklastai sudaro 1–2 % kaulo ląstelių. Osteoklastai kyla iš hemopoetinių mieloidinių ląstelių, iš kurių taip pat formuojasi monocitai, makrofagai ir dendritinės ląstelės. Nediferencijuoti osteoklastų pirmtakai aptinkami kaulų čiulpuose bei kraujyje. Vienbranduolio osteoklasto pirmtako diferenciacija į daugiabranduolį aktyvų osteoklastą reguliuojama daugelio sisteminių ir vietinių citokinų, iš kurių išskiriami du pagrindiniai veiksniai: M-CSF (angl. *macrophage colony-stimulating factor*) ir RANKL (angl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*). Pagrindinė M-CSF paskirtis – didinti osteoklastų pirmtakų kiekį, tuo tarpu RANK ligandas aktyvuoja NF-κB signalinį kelią ir paskatina vienbranduolių osteoklastų pirmtakų jungimąsi į daugiabranduolius osteoklastus bei nulemia osteoklastams specifinių genų aktyvaciją, tokiu būdu paskatindamas funkciškai aktyvių osteoklastų susiformavimą ir kaulo rezorbciją.

Nustatyta, kad uždegimo intensyvumui periodonto audiniuose bei osteoklastų diferenciacijai didelę įtaką daro kelios dešimtys pakitusios raiškos miRNR (13). Keletas diagnostiniu ir terapiniu požiūriu perspektyvių miRNR: miR-146a, miR-140, miR-145, miR-218, miR-34a, miR-223, miR-142-3p, miR-148a.

Periodonto patogenų lipopolisacharai jungiasi su membranoje esančiais patogeną atpažįstančiais receptoriais ir aktyvuoja NF- κ B, o tai paskatina miR-146a raišką. MiR-146a jungiasi prie membranos receptorių ir tokiu būdu slopina tolesnę NF- κ B aktyvaciją bei šiuo neigiamu grįžtamuoju ryšiu stabdo uždegimo propagaciją (14). MiR-146a slopina reaktyvių deguonies formų susidarymą, IL-1 β , IL-6, IL-8 bei TNF- α raišką bei makrofagų chemotaksį (15, 16). Sumažėjusi miR-146a raiška siejama su patologine kaulo rezorbcija (17). Eksperimentiniu būdu padidinta miR-146a koncentracija reikšmingai sumažina uždegiminę reakciją periodonto audiniuose (18), o miR-146a trūkumas siejamas su didesne rizika sirgti uždegiminėmis bei imuninėmis ligomis – RA, sisteminė raudonąja vilklige, psoriaze ir osteoartritu (19). Fushimi ir kiti, 2018 m. nustatė, jog miR-140 dalyvauja osteoblastų diferenciacijos procesuose, moduliudama Wnt3 ir TGF β 3 signalinius kelius (20). Tuo tarpu yra žinoma, kad miR-145 slopina IL-6 ir IL-8 raišką bei mažina IL-1 β paskatiną membranų degradaciją (21, 22). Eksperimentinis miR-145 kiekio padidėjimas slopina makrofagų diferenciaciją, infiltraciją ir bendrą uždegimo intensyvumą (23). Yra nustatyta, kad miR-218 slopina TNF receptorių ir NF- κ B signalinio kelio aktyvumą ir neigiamai veikia osteoklastų diferenciaciją bei mažina kaulo rezorbciją (24). MiR-34a slopina osteoklastams specifinio augimo veiksnio Tgif2 (angl. *transforming growth factor-beta-induced factor 2*) raišką ir mažina osteoklastų aktyvaciją per RANKL signalo slopinimą (25). Keletu tyrimu nustatytas miR-223 raiškos padidėjimas burnos gleivinės audiniuose sergant periodontitu (26). MiR-223 turi įtakos chemokinių (CXCL2, CCL3), interleukinų (IL-6) kiekiui ir neutrofilų infiltracijai į lėtinio uždegimo židinį (27). MiR-142-3p kiekio padidėjimas slopina monocitų diferenciaciją į makrofagus bei dendritinių ląstelių diferenciaciją į osteoklastus. Tokiu būdu miR-142-3p slopina 3 pagrindinių osteoklastų pirmtakų (monocitų, makrofagų ir dendritinių ląstelių) vartimą osteoklastais (28). MiR-148a reikšmingai padidėja M-CSF ir RANKL indukuotos osteoklastogenezės metu. Pelėms su sumažėjusiu kaulų tankiu skiriant miR-148a antagonistą buvo slopinama kaulo rezorbcija ir atstatytas fiziologinis kaulų tankis (29).

Keletas *in vitro* tyrimų nagrinėja miRNR pritaikymą siekiant paskatinti efektyvesnį kaulinio audinio formavimąsi apie dantų implantus (30-34). Titaninių dantų implantų funkcionalizavimui buvo naudojami įvairūs pernešimo sistemų ir miRNR deriniai: titano paviršiaus anodizavimas ir sujungimas su miR-122 (30), miR-21 (31), miR-21 kartu su antimiR-138 (32), taip pat paviršiaus padengimas kalcio jonais ir sujungimas su anitmiR-138 (33) bei aukso nanodalelių ir PLGA (angl.

polylactic-co-glycolic acid) sujungimas su antimiR-204 (34). Šiuose *in vitro* tyrimuose buvo naudojamos kaulų čiulpų bei žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės bei buvo vertinama genų, miRNR ir baltymų ekspresijos pokyčiai: alkalininės fosfatazės (ALP), kaulo morfogeninio baltymo (BMP), kolageno (COL1 ir COL3), osteokalcino (OCN), osteopontino (OPN) ir kt. Modifikuoti dantų implantai neturėjo citotoksinio poveikio bei paskatino osteogeninių genų ekspresiją ir kaulinę mineralizaciją (30-34). Daugelyje minėtų tyrimų efektas vertintas ne vėliau nei po 14 d., tai galimai susiję miRNR irimu dėl fermentų poveikio (pvz.: nukleazių). Tuo tarpu Zhang Y. ir kiti, pateikė įvairių biosuderinamų implantų (dantų implantų, kaulinių implantų, širdies ir kraujagyslių stentų) paviršiaus modifikavimo metodiką naudojant chitosano gelio sujungimą su titaniniu implantu per elektrostatinę sąveiką (CN104018199). Chitosano gelis gali būti surištas su įvairia biologine medžiaga – siRNR, miRNR, DNR. Kitas Zhang Y. ir kt., patentuotas metodas apima biologinės medžiagos (siRNR, miRNR) jungimą su biosuderinamais titaniniais implantais per paviršiaus oksidavimą ir miRNR inkapsuliavimą liposomose (CN102579145). Dar vienas tyrėjų grupės iš Kinijos patentas aprašo hidrogelio pagalba atliekamą miRNR sujungimą su dantų implantais (CN107837243).

Aprašytuose straipsniuose ir patentuose nėra konkretizuojama, kaip miRNR yra apsaugoma nuo nukleazių – fermentų ardančių nukeino rūgštis, įskaitant ir miRNR. Žinoma, kad organizmo endonukleazės ir egzonukleazės ardo neapsaugotas miRNR ir tokiu būdu mažina jų efektyvumą. CN102579145, CN104018199 patentuose aprašoma metodika apima siRNR sujungimą su dantų implantais. SiRNR yra dvigrandė egzogeninės kilmės molekulė, priešingai nei viengrandė endogeninė miRNR. SiRNR panaudojimas gali sumažinti aplinkinių ląstelių gyvybingumą iki 40 proc. (35). Taip pat, minėtuose patentuose nekonkretizuojama, kokios miRNR taikomos ir nekonkretizuojamas siekiamas efektas. Tuo tarpu, CN107837243 patento paraiškoje nurodomas miR-21 pritaikymas siekiant pagreitinti kaulinio audinio kalcifikaciją. Minėtuose straipsniuose aprašomas miR122, miR-21, miR-29b, antimiR204 ir antimiR138 pritaikymas siekiant pagerinti implantų oseintegraciją paskatinant osteogeninių genų transkripciją (30-34).

IŠRADIMO ESMĖ

Išradimas yra titaninis dantų implantas, funkcionalizuotas atrinktų mikro-RNR inhibitorių deriniu. Anti-miRNR oligonukleotidai slopina su uždegimu susijusių miRNR raišką, todėl uždegimo lygis aplink implantą esančiuose audiniuose mažėja. Siekiant užtikrinti lėtą ir tolygų nepažeistų miRNR inhibitorių patekimą į ląsteles yra naudojamos daugiasluoksnės liposomos. Mūsų modifikuoti dantų implantai padidina implantų sukibimo tikimybę ir sutrumpina implanto integracijos į kaulą laiką, taip užtikrinant sėkmingą implantaciją.

TRUMPAS PAVEIKSLŲ APRAŠYMAS

1 pav. Hierarchinis skirtingai išreikštų miRNR grupavimas periodontito ir kontrolinių dantenu audinių mėginiuose: miRNR, aptiktos $\geq 25\%$ mėginių (A) ir miRNR, reikšmingai išjungtos ($N = 177$, $FC \geq 1,5$, $P \leq 0,050$) (B).

2 pav. Santykinė miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p raiška dantenu audiniuose, įvertinta naudojant AT-kPGR. Pacientų, sergančių periodontitu (tik PD), pacientų, sergančių ir PD, ir RA (PD + RA +), ir sveikų kontrolinių grupių (KT), palyginimas. Juodos linijos žymi medianą, * $P < 0,050$, ** $P < 0,010$.

3 pav. Santykinė miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p išraiška dantenu audiniuose, surinktuose iš pacientų, sergančių sunkiu periodontitu (PD, III ir IV stadijos) ir sveikų kontrolinių grupių (KT). Juodos linijos žymi medianą, * $P < 0,050$, *** $P < 0,001$.

4 pav. Santykinė miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p raiška dantenu audiniuose, surinktuose iš periodontitu sergančių pacientų ir kontrolinių pacientų, ir palyginta pagal periodontito jungties netekimo lygio (CAL) (A), kišenių zondavimo gylio (PPD) (B), kraujavimo po zondavimo indekso (BOP) (C) ir kaulų netekimo (BL) (D) rodiklius. Juodos linijos žymi medianą * $P < 0,050$, ** $P < 0,010$ ir *** $P < 0,001$.

5 pav. Fluorescencinės mikroskopijos vaizdai: liposomų su NBD-Chol, įterptų į a) TiO_2 nanovamzdelių paviršius ir b) polietileniminu modifikuotus TiO_2 nanovamzdelių paviršius.

6 pav. miRNR inhibitorių, įterptų į liposomas, UV/Vis spektrai.

7 pav. Ląstelių kultivavimo plokštelės schema, iliustruojanti poveikio ląstelėms variantus. Skirtingi pilkos spalvos atspalviai atspindi skirtingas transfekcijai naudojamų miRNR (miR) inhibitorių koncentracijas. NK – neigiama kontrolė.

8 pav. Ląstelių kultivavimo plokštelės schema, iliustruojanti poveikio ląstelėms variantus. I – titano diskai lygiu paviršiumi, nesujungti su liposomų ir miR inhibitorių kompleksu, II – perforuoti diskai, nesujungti su liposomų ir miR inhibitorių kompleksu.

IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šio tyrimo tikslas buvo išanalizavus miRNR raišką PD paveiktuose ir sveikuose dantenu audiniuose atrinkti PD specifines miRNR bei panaudojus atitinkamus inhibitorius įvertinti šių miRNR raiškos pokyčius *in vitro* ir *in vivo* sistemose.

RNR išskyrimas

Užšaldyti dantenų audiniai buvo trinami iki smulkių miltelių. Visuminė RNR gryninta naudojant *Trizol*TM (Invitrogen, TFS, JAV) reagentą, remiantis gamintojo protokolu. Išgryninta RNR saugoma –80 °C temperatūroje.

RNR iš ląstelių kultūrų mėginių buvo skiriama, naudojant *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) rinkinį, remiantis gamintojo protokolu. Po tripsinizavimo etapo ant ląstelių buvo pilama *QIAzol*® lizės reagento (Qiagen) ir inkubuojama 5 min. Po inkubacijos užnešama 200 µL chloroformo ir inkubuojama dar 2–3 min. Kaip RNR gryninimo, kopijinės DNR (kDNR) sintezės ir kiekybinės polimerazinės grandininės reakcijos (kPGR) efektyvumo kontrolė buvo naudojama 25 fmol sintetinės miRNR – cel-miR-39. Išgryninta RNR buvo laikoma –80 °C temperatūroje. RNR koncentracija ir kiekybiniai parametrai buvo vertinami *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific, JAV) spektrofotometru bei *Qubit 4* (Invitrogen) fluorometru.

Visuminė miRNR raiškos analizė miRNR mikrodalelėmis

Iš viso šiame etape ištirta 16 dantenų audinių. Trumpai, 100 ng visuminės RNR buvo maišoma su kontroline sintetine miRNR *Spike-In solution* (Agilent Technologies, JAV), defosforilinama, denatūruojama ir žymima 3-pCp cianinu, remiantis *miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (Agilent Technologies) protokolu. Žymėti mėginiai tuomet buvo džiovinami koncentratoriuje, resuspenduojami ir 20 val. hibridizuojami ant *Human microRNA Microarray 8 x 60* formato gardelių hibridizavimo krosnyje 55 °C temperatūroje. Genu raiškos gardelių plovimo rinkinio buferiais nuplautos gardelės buvo nedelsiant skenuojamos *Agilent SureScan* skeneriu. Gardelių skenavimui ir analizavimui naudoti šie programinės įrangos paketai: *Agilent Microarray Scan Control*, *Feature Extraction software v10.7* ir *GeneSpring GX v14.9* (AT, JAV).

Kopijinės DNR (kDNR) sintezė

miRNR raiškos analizei dantenų audinių mėginiuose reikalinga kDNR buvo sintetinama atvirkštinės transkripcijos (AT) reakcijos metu, naudojant *TaqMan*® *MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinį ir specifinį *RT Primer Pool* pradmenų mišinį, laikantis gamintojo rekomendacijų (Applied Biosystems (ABI), TFS). Sumaišius ir nucentrifugavus visus reakcijai reikalingus reagentus, į 12 µL/1 AT reakcijos mišinio reakciją, buvo pridėdama 3 µL (350 ng) visuminės RNR ir inkubuojama 5 min. AT reakcija buvo atliekama termocikleryje 30 min 16 °C, 30 min 42 °C, 5 min 85 °C ir pasibaigus reakcijai laikoma 4 °C temperatūroje.

kDNR sintezei ląstelių kultūros mėginiuose buvo taip pat naudojamas *TaqMan*® *MicroRNA Reverse Transcription Kit* rinkinys, tačiau kiekvienam genui ir kiekvienam mėginiui buvo atliktos atskiros kDNR reakcijos, besiskiriančios specifiniais smeigtuko formos miRNR pradmenimis

(*TaqMan® MicroRNA Assay* for miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p; gamintojo kodai - atitinkamai 002234, 002278, 000468 ir 000494), remiantis gamintojo protokolu (viskas iš ABI, TFS) (1 lentelė). Į 3,5 µL/1 reakcijos mišinio reakciją pridedama 1,5 µL miRNR pradmenų ir 2,5 µL (1–10 ng) visuminės RNR, centrifuguojama ir tuomet inkubuojama termocikleryje tomis pačiomis sąlygomis, kaip aprašyta anksčiau. Susintetinta kDNR buvo iškart naudojama tolimesniuose tyrimo etapuose arba iki panaudojimo saugoma –20 °C temperatūroje.

1 lentelė. Tyrime naudojamų *TaqMan® Assays* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, JAV) gamintojo kodai ir subrendusių miRNR nukleotidų sekos.

miRNR pavadinimas	Kodas	Subrendusios miRNR nukleotidų seka
miR-140-3p	002234	UACCACAGGGUAGAACCACGG
miR-145	002278	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU
miR-146a	000468	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miR-195	000494	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC

Kiekybinė atvirkštinės transkriptazės polimerazinė grandininė reakcija (AT-kPGR)

Atrinktų miRNR raiška didesnėje dantenų audinių mėginių imtyje buvo tiriama naudojant pagal vartotojo užsakymą pagamintas mažo tankio *TaqMan* gardeles (*Customized TaqMan® Low Density Arrays*, ABI, TFS). Jomis vienu metu galima tirti 16 miRNR raišką 8 mėginiuose, atliekant tris pakartojimus. Kiekvienam mėginiui buvo ruošiamas atskiras reakcijos mišinys, sudarytas iš 2 × *TaqMan™ Universal Master Mix II, No AmpErase UNG*, vandens be nukleazijų ir kDNR. 100 µL buvo suleidžiama į paruoštos gardelės užpildymo rezervuarą ir centrifuguojama 2 min 2000 rpm greičiu. Tuomet užsandarintos gardelės buvo patalpinamos į *ViiA7™ Real-Time PCR* sistemą ir naudojant *ViiA 7 Software v1.2* programinę įrangą (viskas iš ABI, TFS) paleidžiama programa gamintojo nurodytu temperatūriniu režimu: 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, 40 ciklų po 15 s 95 °C ir 1 min 60 °C temperatūroje.

Tiriant miRNR raišką ląstelių kultūrų mėginiuose galutinį vienos reakcijos tūrį (20 µL) sudarė 2 × *TaqMan™ Universal Master Mix II, No AmpErase UNG*, 20 × *TaqMan™ MicroRNA Assay* (abu iš ABI, TFS), 1,33 µL kDNR ir vanduo be RNazių, remiantis gamintojo rekomendacijomis. Kiekviena miRNR buvo tiriama atliekant tris pakartojimus. Taršos nustatymui naudojama kontrolė, kai vietoj mėginio įnešamas vanduo (angl. *no-template control*, *NTC*). Paruošta plokštelė trumpai nucentrifuguojama ir perkeliama į prietaisą. Reakcija buvo atliekama, naudojant anksčiau išvardintus prietaisą, programinę įrangą ir temperatūrinį režimą, ciklų skaičių trečiajame žingsnyje padidinant iki 50.

Gauti duomenys buvo analizuojami naudojant *SPSS v.20.0* (IBM, Armonk, NY) ir *GenEx v.7.0* (MultiD Analyzes AB, Švedija) programinių įrangų paketus. miRNR raiškos duomenys buvo normalizuojami pagal sintetinę kontrolę cel-miR-39. Normalizuoti ir į logaritminę skalę ($\log_2$) konvertuoti įverčiai buvo analizuojami $\Delta\Delta C_t$ metodu. miRNR raiškos analizei tarp tiriamųjų grupių bei pagal klinikinius-patologinius, tiriamąją ligą modifikuojančius ir demografinius rodiklius taikytas Stjudento *t* testas. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai *P* reikšmingumo rodiklis buvo $\leq 0,050$, o $FC \geq 1,5$.

Visuminis miRNR raiškos tyrimas dantenų audiniuose

Visuminei miRNR raiškos analizei buvo pasirinkta 16 dantenų audinių mėginių, surinktų iš PD sergančių (PD+) (N=8) ir PD nesergančių (PD-) (N=8) asmenų. Iš 2569 mikrogardelėmis tirtų miRNR, tolesnėje analizėje buvo naudojamos 760 miRNR, kurių raiška vyko ≥ 25 % mėginių. (1A pav.).

Palyginus PD paveiktus audinius su periodontologiškai sveikais dantenų audiniais (PD+ vs. PD-) nustatytos 177 pakitusios raiškos miRNR (1B pav.).

Daugiau negu 2 kartus padidėjusi raiška buvo nustatyta 140 (79,1 %) miRNR atveju, įskaitant miR-30a-5p, -125a-3p, -126-5p, -1273g-3p, -140-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -575, -630 ir -3917. Palyginus tik PD sergančius asmenis (PD+RA-, N=4) su visiškai sveikais asmenimis – kontroline grupe (KT, N=4), buvo nustatyta 118 reikšmingai pakitusios raiškos miRNR. Daugumos miRNR (N=77, 65,3 %) raiška buvo padidėjusi (miR-140-3p, -550a-3-5p, -765, -1273g-3p, -3917 ir kt.), o 41 (34,7 %) – sumažėjusi (miR-1246, -210-3p, -375 ir kt.). Siekiant įvertinti miRNR sąsajas su kitomis uždegiminėmis ligomis, buvo lyginami PD ir RA sergančiųjų (PD+RA+, N=4) ir kontrolinės grupės asmenų dantenų mėginiai. Nustatyta, jog 22 iš 29 pakitusios raiškos miRNR (miR-550a-3-5p, -140-3p ir -765) buvo padidėjusios raiškos.

Visuminės miRNR raiškos analizės rezultatai taip pat buvo naudojami su PD susijusių miRNR identifikavimu RA sergančių ir reumatologiškai sveikų tiriamųjų grupėse. miRNR atrinktos remiantis jų raiškos pokyčiu kartais, reikšmingumo rodikliu *P* bei atsižvelgiant į galimą jų funkciją autoimuninių ir uždegiminių procesų reguliacijoje. Labiausiai pakitusios raiškos miRNR buvo atrinktos atlikus palyginimus PD+ vs. PD-, PD+RA- vs. KT, ir PD+RA+ vs. KT, grupėse. Devynios statistiškai reikšmingai pakitusios raiškos miRNR (miR-30a-5p, -125a-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -423-5p, -575 ir -630) buvo nustatytos atlikus PD+ vs. PD- ir PD+RA+ vs. KT grupių palyginimą. Be to, PD+ ir PD+RA- sergančiųjų audiniuose identifikuotos 4 išaugusios raiškos miRNR (miR-126-5p, -195-5p, -1273g-3p ir -3917), palyginus atitinkamai su PD- ir KT. Reikšmingai padidėjusios raiškos miR-140-3p ir -765 buvo nustatyta atitinkamai

visose trijose minėtose grupėse bei PD+RA– vs. KT. Be to, miR-140-3p ir -765 raiška buvo reikšmingai padidėjusi ir PD+RA+ grupėje, lyginant su KT.

Atsižvelgiant į visuminės miRNR raiškos analizės rezultatus, tolesniam tyrimo etapui buvo pasirinktos 15 miRNR: miR-30a-5p, -125a-3p, -126-5p, -140-3p, -145-5p, -146a-5p, -155-5p, -195-5p, -423-5p, -550a-3-5p, -575, -630, -765, -1273g-3p ir -3917. Toliau, nustatyti pokyčiai buvo validuojami didesnėje dantenų audinių mėginių imtyje (N=80) AT-kPGR metodu.

miRNR raiškos validavimas dantenų audiniuose

AT-kPGR metodu ištyrus 80 dantenų audinių mėginių nustatyta, kad dalis tirtų miRNR buvo reikšmingai susijusios su PD. Šiame etape, kaip ir visuminės miRNR raiškos analizės atveju, tik PD sergančių asmenų audiniuose (N=25), nustatyta padidėjusi miR-145-5p ir miR-140-3p raiška (atitinkamai FC=2,1, $P<0,0001$ ir FC=1,4, $P=0,019$), palyginus su KT (N=25) grupe (2 pav.). Mikrogardelių analizėje gautus rezultatus atitiko ir išaugusi miR-140-3p raiška (FC=1,5, $P=0,017$), kuri buvo nustatyta palyginus PD+RA+ tiriamosios grupės audinius (N=23) su KT dantenų audinių mėginiais (2 pav.). Vis dėlto, miR-125a-3p ir miR-1273g-3p raiška buvo sumažėjusi (FC<-1,5; $P<0,05$) PD+RA+ vs. KT ir PD+ vs. PD– (N=32 vs. 48) lyginamosiose grupėse. Statistiškai reikšmingų miR-146a-5p raiškos pokyčių dantenų audinių mėginiuose nustatyta nebuvo.

miR-145-5p ir miR-140-3p raiška dantenų audiniuose buvo reikšmingai išaugusi sunkia PD forma (III ir IV stadijos) sergančių asmenų grupėje. Palyginus su KT grupe, sunkia PD forma sergančių asmenų grupėje nustatyta reikšmingai padidėjusi miR-145-5p ir miR-140-3p raiška (atitinkamai FC=2,2, $P<0,001$ ir FC=1,3, $P=0,026$) (3 pav.), ir sumažėjusi miR-125a-3p raiška (FC=2,2, $P<0,001$). Reikšmingai pakitusi miR-145-5p raiška buvo nustatyta sunkia PD forma sergančiųjų dantenų audiniuose, palyginus su vidutinio sunkumo PD (II stadija) sergančiųjų asmenų audiniais (FC=2,0, $P=0,007$). Atlikus vidutinio sunkumo PD vs. KT atvejų palyginimą nustatyta statistiškai reikšmingai išaugusi miR-195-5p (FC=1,7, $P=0,038$) ir sumažėjusi miR-125a-3p (FC=-3,5, $P=0,013$) raiška.

Taip pat, nustatytos reikšmingos pasirinktų miRNR asociacijos su klinikiniais-patologiniais PD rodikliais, tokiais kaip CAL, PPD, BOP ir BL. Daugiau nei 2,2 karto padidėjusi miR-145-5p raiška ($P<0,001$) ir 1,6 karto sumažėjusi miR-3917 ($P=0,022$) raiška buvo nustatyta tiriamųjų, kurių CAL buvo $\geq 2,5$ mm, atveju, palyginus su asmenimis, kurių CAL – $< 2,5$ mm (4A pav.). MiR-145-5p raiškos padidėjimas (FC=2,1, $P<0,001$) dantenų audinyje taip pat buvo nustatytas asmenims, kurių PPD buvo ≥ 3 mm, palyginus su tiriamaisiais, kurių PPD buvo < 3 mm (4B pav.). Daugiau negu 2 kartus padidėjusi miR-145-5p ($P<0,001$) ir miR-140-3p ($P=0,009$) bei tiek pat kartų sumažėjusi

miR-125a-3p ($P=0,001$) raiška nustatyta grupėje, kurią sudarančių tiriamųjų BOP buvo $\geq 33\%$ (4C pav.). MiR-145-5p ($P<0,001$) ir miR-140-3p ($P=0,007$) raiškos padidėjimas (4D pav.) bei miR-125a-3p sumažėjimas ($P=0,001$) buvo nustatytas palyginus tiriamųjų, kurių BL rodikliai buvo $\geq 20\%$ ir $<20\%$, grupes.

Ketrios miRNR – miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195, kurių raiška dantenų audiniuose buvo išaugusi labiausiai, buvo pasirinktos tolimesniems tyrimo etapams. Minėtos miRNR atrinktos remiantis raiškos pokyčiu kartais lyginamosiose grupėse, reikšmingumo rodikliu P , sąsąjį su PD klinikiniais-patologiniais rodikliais bei potencialia jų funkcija uždegiminiuose ar autoimuniniuose procesuose. Tolimesniems *in vitro* ir *in vivo* eksperimentams buvo naudojami atrinktų miRNR inhibitoriai, kurių perkėlimui į ląsteles buvo naudojamos daugiasluoksnės liposomos.

miRNR inhibitoriai

Mes pasirinkome ~100 nt ilgio, specifinį subrendusių miRNR prisijungimą užtikrinančius stiebo-kilpos tipo inhibitorius. Tyrimo metu tiek transfekcijos, tiek atvirkštinės transkripcijos etapuose buvo naudojamos tos pačios miRNR specifinės sekos, tokiu būdu užtikrinant specifiškumą ir atkartojamumą. Mūsų tyrime naudojami miRNA inhibitoriai yra komerciniai (TFS), todėl yra patikrinti, sertifikuoti ir tinkami naudojimui. Išsami informacija pateikta 2 lentelėje.

2 lentelė. Informacija apie naudojamas miRNR ir jų stiebo-kilpos (angl. stem-loop) sekas

miRNR hsa-miR-	Inhibitoriaus kodas	Subrendusios miRNR seka	Stiebo-kilpos seka	Vieta chromosomoje, Build GRCh38
-145-5p	MH11480	GUCCAGUUUU CCCAGGAAUC CCU	CACCUUGUCCUCACGGUCC AGUUUCCCAGGAAUCCCU UAGAUGCUAAGAUGGGGAU UCCUGGAAAUACUGUUCUU GAGGUCAUGGUU	Chr.5: 149430646 - 149430733 [+]
-140-3p	MH12503	UACCACAGGG UAGAACCACG G	UGUGUCUCUCUGUGUCC UGCCAGUGGUUUUACCCUA UGGUAGGUUACGUCAUGCU GUUCUACCACAGGGUAGAA CCACGGACAGGAUACCGGG GCACC	Chr.16 - 69933081 - 69933180 [+]
-195-5p	MH10827	UAGCAGCACA GAAAUUUGG C	AGCUUCCUGGCUCUAGCA GCACAGAAAUUUGGCACA GGGAAGCGAGUCUGCCAAU AUUGGCUGUGCUGCUCCAG GCAGGGUGGUG	Chr.17 - 7017615 - 7017701 [-]
-146a-5p	MH10722	UGAGAACUGA AUUCCAUGGG UU	CCGAUGUGUAUCCUCAGCU UUGAGAACUGAAUCCAUG GGUUGUGUCAGUGUCAGAC CUCUGAAAUUCAGUUCUUC AGCUGGGAUAUCUCUGUCA UCGU	Chr.5 - 160485352 - 160485450 [+]

miRNR inhibitorių pateikimas naudojant paviršiaus dengimo technologiją

MiRNR pateikimas naudojant paviršiaus dengimo technologiją susideda iš dviejų etapų: TiO_2 paviršiaus modifikavimo nanovamzdelių matricomis bei miRNR inhibitorių inkorporavimo į liposomas. TiO_2 nanovamzdelių matricos buvo paruoštos įmerkiant Ti foliją (99,9 % grynumo, 0,1 mm storio) į termostatuojamą stiklinę celę su etilenglikoliu, 0,3 % NH_4F (masės dalimi), 20 ml L^{-1} H_2O ir anoduojant 30 min, 20 ± 1 °C temperatūroje. Anoduojant titano foliją buvo naudojama 50 V įtampa ir dvi platinos plokštelės, kaip katodai. Po procedūros mėginiai buvo kaitinami 2 valandas 450 °C temperatūroje, oro atmosferoje. Po šios procedūros susidarė tolygūs, tvarkingai visame paviršiuje pasiskirstę TiO_2 nanovamzdeliai, kur titano nanovamzdelių skersmuo yra tarp 100 ir 120 nm, o jų ilgis maždaug 3 μm . Po to, TiO_2 nanovamzdeliai buvo modifikuojami polietileniminu, siekiant užlaikyti liposomas nanovamzdeliuose bei kontroliuoti jų išsiskyrimą. Siekiant patikrinti liposomų įsiterpimą į TiO_2 nanovamzdelius, buvo naudojama fluorescencinė mikroskopija. Vienasluoksnės liposomos su fluorescuojančiu agentu – NBD-Chol ((22-(N-(7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol-4-il)amino)-23,24-Bisnor-5-Cholen-3 β -Olis) buvo paruoštos naudojant 10 nM DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocholino), Chol (Cholesterolio) ir 25 mM NBD-Chol chloroformo tirpalus. 60 μL DOPC, 40 μL Chol ir 1 μL NBD-Chol buvo įpilti į mėgintuvėlį. Po to, mėgintuvėlis su lipidais buvo garinamas 1 val. azoto dujų srovėje siekiant pašalinti tirpiklį. Po 1h, mėgintuvėlyje susidariusi lipidinė plėvelė buvo užpilama fosfatinio buferinio tirpalu (0,1 M NaCl ir 0,01 M NaH_2PO_4 , esant pH 7,4) iki norimos koncentracijos (1 mM) ir intensyviai maišoma iki tol, kol ant mėgintuvėlio sienelių nebebuvo matyti lipidinės plėvelės. Tada liposomų tirpalas buvo 21 kartą buvo ekstruduojamas per 100 nm polikarbonato membraną, siekiant gauti liposomas, kurių dydis būtų maždaug 100 nm.

Liposomos, turinčios fluorescuojantį agentą, buvo inkubuotos 1 val. polietileniminu modifikuotų ir nemodifikuotų TiO_2 nanovamzdelių paviršiuje. Po inkubacijos, TiO_2 nanovamzdelių paviršius buvo nuplautas dideliu kiekiu buferinio tirpalo ir po to atlikti matavimai, naudojant fluorescencinę mikroskopą. 5 paveikslo A dalyje matyti, kad liposomų fluorescencija neužfiksuota polietileniminu nemodifikuotų TiO_2 nanovamzdelių paviršiuje. Tačiau polietileniminu modifikuotų TiO_2 nanovamzdelių paviršiuje yra matoma akivaizdi liposomų fluorescencija (5B pav.).

Į liposomas įterpti miRNR inhibitoriai

Į liposomas įterpti miRNR inhibitoriai buvo paruošti naudojant 10 nM DOPC, Chol chloroformo tirpalus ir 1 μM miRNR inhibitorių vandeninį tirpalą. Pirma, 1,5 mM liposomų tirpalas (molinis lipidų santykis buvo 60 % DOPC ir 40 % cholesterolio) buvo paruoštas 1 valandą azoto dujų srovėje garinant norimą kiekį DOPC ir Chol lipidų tirpalą. Po garinimo, susidariusi lipidinė plėvelė

buvo užpilta buferiniu tirpalu (0,1 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄, esant pH 7,4) bei 1 µM miRNR inhibitoriumi ir maišoma tol, kol lipidinė plėvelė nebebuvo matoma. Po to liposomų tirpalas 21 kartą buvo ekstruduojamas per 100 nm polikarbonato membraną, siekiant gauti maždaug 100 nm liposomos dydį. Po ekstruzijos liposomų tirpalas kartu su miRNR inhibitoriais buvo dializuojamas, naudojant dializės maišelį (molekulinės masės riba 12–14 kDa). Dializės maišelis, kuriame buvo liposomų tirpalas su miRNR inhibitoriais buvo įleistas į cheminę stiklinę su buferiniu tirpalu (0,1 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄, esant pH 7,4) ir švelniai maišomas 48 valandas esant 4 °C temperatūrai. Dializės procedūra reikalinga pašalinti iš liposomų vidų neišterpusioms miRNR inhibitorių molekulėms. Buferinio tirpalo tūris buvo parinktas 1000 kartų didesnis nei liposomų tirpalo tūris. Buferinis tirpalas taip pat buvo pakeistas po 24 valandų. Inhibitorių įsiterpimą į liposomas nustatymui buvo naudota UV/Vis spektroskopija, kuri parodo nukleino rūgščių (DNR ir RNR) absorbciją, paprastai gaunant būdingą smailę ties 260 nm bangos ilgiu. Po liposomų dializės tirpalas buvo matuojamas naudojant UV/Vis spektroskopiją (kaip fonas buvo naudojamos liposomos be miRNR inhibitorių). 6 pav., matoma, jog tipinė absorbcijos smailė pastebėta esant 260 nm bangos ilgiui. Tai rodo, miRNR inhibitorių yra įsiterpimą į liposomas.

Biologiškai aktyvių liposomų efektyvumo vertinimas ląstelių kultūroje

Siekdami funkciškai įrodyti, kad pasirinktų miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p inhibitoriai veikdami atitinkamų miRNR raišką ląstelėse, slopina jų veikimą, atlikome miRNR raiškos analizę skirtingais agentais veiktose ląstelėse, augintose ant specialių plastikinių ląstelių kultūrų kultivavimo plokštelių. Uždegiminiais veiksniais indukuotos mezenchiminės kamieninės ląstelės buvo kultivuojamos 24 šulinėlių plokštelėse su auginimo terpe ir laikomos inkubatorijoje, kuriame palaikoma 37 °C temperatūra ir 5 % CO₂ koncentracija. Ląstelės buvo veiktos (1) tik liposomomis, (2) liposomų ir miRNR inhibitorių kompleksu (lipofekcija), arba (3) nebuvo paveiktos niekuo ir buvo naudojamos kaip neigiama kontrolė (NK). Ląstelės buvo veikiamos trimis skirtingomis miRNR inhibitorių mišinio koncentracijomis komplekse su liposomomis. Eksperimentas buvo vykdomas atliekant tris pakartojimus (7 pav.). Transfekcijos efektyvumas buvo vertinamas trimis laiko momentais – 24, 48 ir 72 valandas po poveikio.

Iš tiriamąja medžiaga paveiktų ir kontrolinės grupės ląstelių išskyrus RNR buvo atliekama genų raiškos analizė AT-kPGR metodu. Įvertinus tiriamų miRNR raiškos skirtumus tarp NK ir ląstelių, veiktų tik liposomomis, visais trimis laiko momentais reikšmingų skirtumų užfiksuota nebuvo. miRNR raiška ląstelėse, veiktose liposomų ir miRNR inhibitorių kompleksu išliko panaši visais analizuojamais laiko momentais. miRNR raiška ląstelėse, veiktose liposomų ir miRNR inhibitorių kompleksu, buvo reikšmingai sumažėjusi, palyginus su NK arba ląstelėmis, veiktomis tik

liposomomis. Rezultatai rodo, kad lipofekcija yra tinkamas ir efektyvus būdas anti-miR oligonukleotidams per membraną patekti į ląstelę, kur jie gali slopinti atitinkamų miRNR raišką.

Nustačius reikšmingus miRNR raiškos skirtumus tarp liposomų bei inhibitorių kompleksu veiktų ir NK grupės ląstelių, pasirinkome optimalią miRNR inhibitorių koncentraciją, reikalingą efektyviai slopinti atitinkamų miRNR išraišką bei atlikome analogišką eksperimentą augindami ląsteles ant titano paviršių. Ląstelės buvo auginamos 24 šulinėlių plokštelėje, kurių dugnas buvo padengtas keturių rūšių titano diskais ($\varnothing 1,9 \text{ cm}^2$): (1) diskais lygiu paviršiumi (2) perforuotais diskais, (3) perforuotais diskais, sujungtais su liposomomis, ir (4) perforuotais diskais, sujungtais su liposomų ir miRNR inhibitorių kompleksu. Ląstelės, augintos ant perforuotų diskų, nesujungtų su liposomų ir miR inhibitorių kompleksu, buvo naudojamos kaip NK. Eksperimentas buvo vykdomas, atliekant 6 pakartojimus (8 pav.). Jo metu buvo vertinamas ląstelių gyvybingumas, genų raiškos pokyčiai bei liposomų išsiskyrimo laikas trimis laiko momentais – 24, 48 ir 72 valandos po poveikio tiriamąja medžiaga.

Ląstelių gyvybingumas ir ląstelių proliferacijos intensyvumas buvo panašūs ląstelėse, kultivuotose tiek ant lygaus paviršiaus, tiek ant perforuotų titano diskų visais trimis analizuojamais laiko momentais. Kaip ir pirmoje eksperimento dalyje, auginant ląsteles ant plastikinių plokštelių, palyginus tiriamų miRNR raišką tarp ląstelių, kultivuočių ant perforuotų diskų bei veiktų tik liposomomis ir NK grupės, reikšmingų skirtumų nustatyta nebuvo. Tolygus miRNR slopinimas buvo pastebėtas kiekvienu analizuojamuoju momentu ląstelėse, kultivuotose ant perforuotų diskų bei veiktų liposomų ir miRNR inhibitorių kompleksu. Tokie rezultatai rodo, kad liposomos yra atpalaiduojamos lėtai ir tolygiai, kas yra būtina norint nuslopinti uždegiminių miRNR funkciją, užtikrinti sėkmingą prigijimą ir ilgesnį dantų implantų naudojimą. Palyginus su ant plastikinio paviršiaus auginomis ląstelėmis, ant titano paviršiaus augusių ląstelių gyvybingumas buvo šiek tiek mažesnis, tačiau genų raiškos skirtumai tarp minėtų grupių buvo analogiški. Tokie rezultatai rodo, kad remiantis titano fizikinėmis savybėmis ir aktyvia ant jo auginamų ląstelių proliferacija, titanas yra tinkama medžiaga modifikuotų dantų implantų gamybai.

Anodizuoto ir su biologiškai aktyviomis liposomomis sujungto danties implanto implantavimas laboratoriniams gyvūnams

Tyrimui buvo naudojama dvylika 7–10 mėn. amžiaus, 3,5–4 kg sveriančių triušių patelių. Minėtas amžiaus intervalas buvo pasirinktas todėl, kad triušių skeletas pilnai susiformuoja maždaug šeštąjį gyvenimo mėnesį. Pasirinktas imties dydis leidžia išlaikyti ne mažesnę nei 80 proc. kriterijaus galią bei 5 proc. reikšmingumo lygmenį. Tyrimo laikotarpiu gyvūnai buvo laikomi, maitinami bei girdomi tokiomis pačiomis sąlygomis ir režimu.

Tyrimė buvo naudojami keturių rūšių anodizuoti implantai: 1) implantai lygiu paviršiumi, 2) perforuoti implantai, 3) perforuoti implantai sujungti su liposomomis, ir 4) perforuoti implantai sujungti su liposomų ir miRNR inhibitorių kompleksu.

Į kiekvieno triušio kaulus buvo implantuoti visų keturių rūšių implantai – po du kiekvienoje kojoje 7 mm atstumu vienas nuo kito. Implantai buvo sukami į paruoštas blauzdikaulių proksimalines sritis ir sriegiami tol, kol implanto sraigtinė dalis buvo visiškai įvesta į kaulinį audinį.

Eutanazija buvo atliekama keturiems triušiams vienu metu trimis skirtingais laiko momentais – praėjus 1, 3 ir 6 savaitėmis po implantacijos. Skirtingi laiko periodai parinkti siekiant įvertinti kaulo formavimosi eigą skirtingu laikotarpiu po implantacijos. Terapinis poveikis buvo įvertintas mikrokompiuterinės tomografijos metodu, analizuojant kaulinius blokus su implantais ir vertinant kaulo tūrio procentą, trabekulių tankį ir kiekį.

Praėjus vienai savaitei po implanto įdėjimo, kaulų žievės išorinėse dalyse buvo pastebėti nekrozės požymiai, vis dėlto vidinėse dalyse buvo nustatyta kaulo neoformacija. Minėtu laiko momentu nebuvo pastebėta jokių reikšmingų skirtumų tarp visų keturių rūšių implantų. Skirtumai tarp keturių analizuojamų implantų variantų buvo nustatyti triušiuose, eutanizuotuose praėjus 3 savaitėms po implantavimo procedūros. Reikšmingai didesnis trabekulių kiekis ir kaulo tūris buvo nustatytas analizuotose kauliniuose blokuose su liposomų ir miRNR inhibitorių kompleksu sujungtais implantais, palyginus su kitų trijų tipų implantais. Didelis trabekulių kiekis ir kaulo tūris buvo aptiktas kauliniuose blokuose, išpreparuotose praėjus šešioms savaitėms po implantavimo triušiams. Šie pakitimai stebėti su liposomomis ir inhibitoriais sujungtų implantų sąlyčio su kauliniu audiniu vietose. Analizuojamu laiko momentu kitų rūšių implantų įsukimo vietose buvo matomi kaulo rezorbcijos požymiai. Taigi, perforuoti ir su biologiškai aktyviomis liposomomis sujungti implantai, dėl reikšmingai greitesnės integracijos į kaulą, galėtų tapti alternatyva įprastiems dantų implantams.

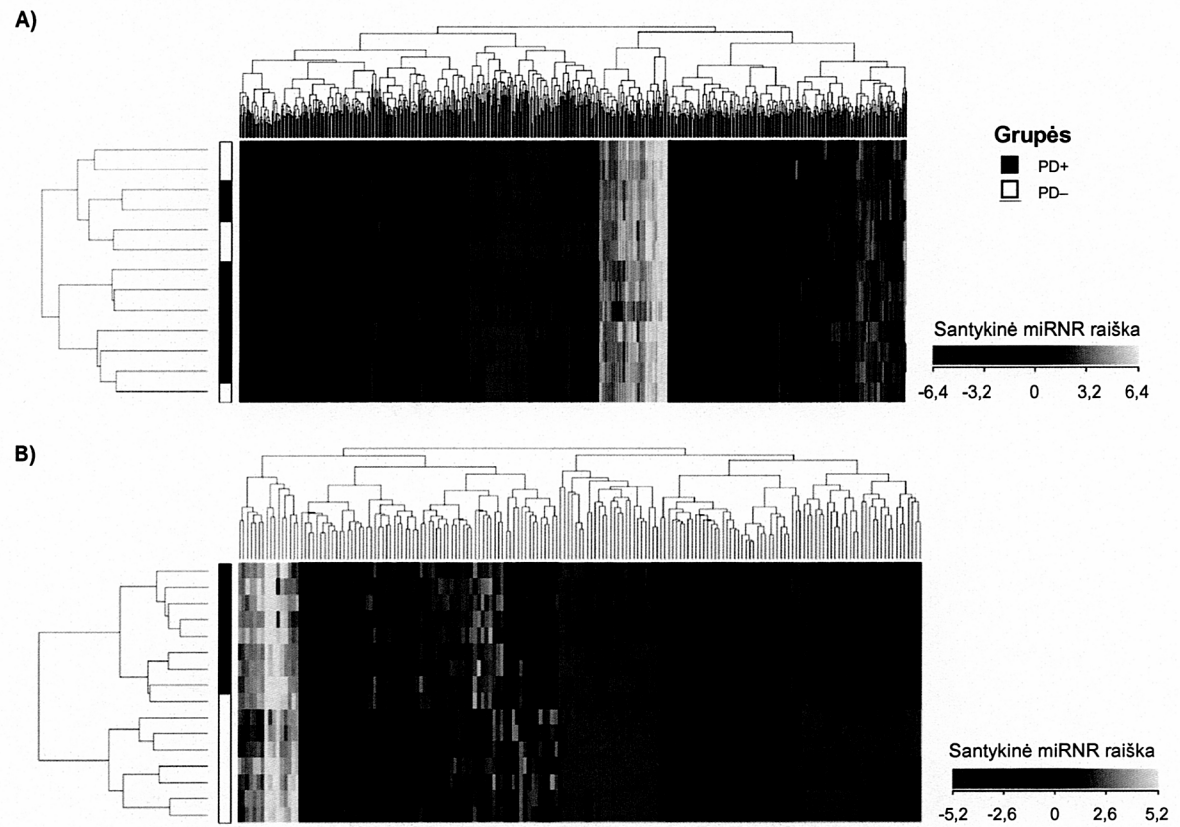
Literatūros sąrašas:

1. Saresella M, La Rosa F, Piancone F, et al. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2016;11:23. Published 2016 Mar 3. doi:10.1186/s13024-016-0088-1
2. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999;18(49):6853-6866. doi:10.1038/sj.onc.1203239
3. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023-. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
4. Agnihotri R, Gaur S. Rheumatoid arthritis in the elderly and its relationship with periodontitis: a review. *Geriatr Gerontol Int* 2014;14:8-22
5. Blair HA, Deeks ED. Infliximab Biosimilar (CT-P13; Infliximab-dyyb): A Review in Autoimmune Inflammatory Diseases. *BioDrugs.* 2016;30(5):469-480. doi:10.1007/s40259-016-0193-2
6. Jha A, Upton A, Dunlop WC, Akehurst R. The Budget Impact of Biosimilar Infliximab (Remsima®) for the Treatment of Autoimmune Diseases in Five European Countries. *Adv Ther.* 2015;32(8):742-756. doi:10.1007/s12325-015-0233-1
7. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, et al., An estimate of the total number of true human miRNAs, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue 7, 23 April 2019, Pages 3353–3364, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz097>
8. R. Dai, S. A. Ahmed. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res* 2011; 157:163-179.
9. R. C. Page, P. I. Eke. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol.* 2007;78:1387–99.
10. P. I. Eke, B.A. Dye, L. Wei, G. O. Thornton-Evans, and R.J. Genco. Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010. *J DENT RES* 2012 Oct;91(10):914-20
11. Singh P. Understanding peri-implantitis: a strategic review. *J Oral Implantol.* 2011;37(5):622-626. doi:10.1563/AAID-JOI-D-10-00134
12. Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017;62:1-12. doi:10.1016/j.jdent.2017.04.011
13. Lozano C, Duroux-Richard I, Firat H, Schordan E, Apparailly F. MicroRNAs: Key Regulators to Understand Osteoclast Differentiation?. *Front Immunol.* 2019;10:375. Published 2019 Mar 7. doi:10.3389/fimmu.2019.00375
14. Bhaumik D, Scott G, Schokrpur S, Patil C, Campisi J, Benz C. Expression of microRNA-146 suppresses NF-κB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* (2008) 27:5643–7. doi:10.1038/onc.2008.171
15. Zheng C, Shu Y, Luo Y, Luo J. The role of miR-146a in modulating TRAF6-induced inflammation during lupus nephritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* (2017) 21:1041–8.
16. Li M, Wang J, Fang Y, Gong S, Li M, Wu M, et al. MicroRNA-146a promotes mycobacterial survival in macrophages through suppressing nitric oxide production. *Sci Rep* (2016) 6:23351. doi:10.1038/srep23351
17. Ammari M, Presumey J, Ponsolles C, Roussignol G, Roubert C, Escriou V, et al. Delivery of miR-146a to Ly6C high monocytes inhibits pathogenic bone erosion in inflammatory arthritis. *Theranostics.* (2018) 8:5972–85. doi: 10.7150/thno.29313
18. Germanier Y, Tosatti S, Brogini N, Textor M, Buser D. Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(3):251-257. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01222.x
19. Xu W-D, Lu M-M, Pan H-F, Ye D-Q. Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases. *Inflammation* (2012) 35(4):1525–9. doi:10.1007/s10753-012-9467-0

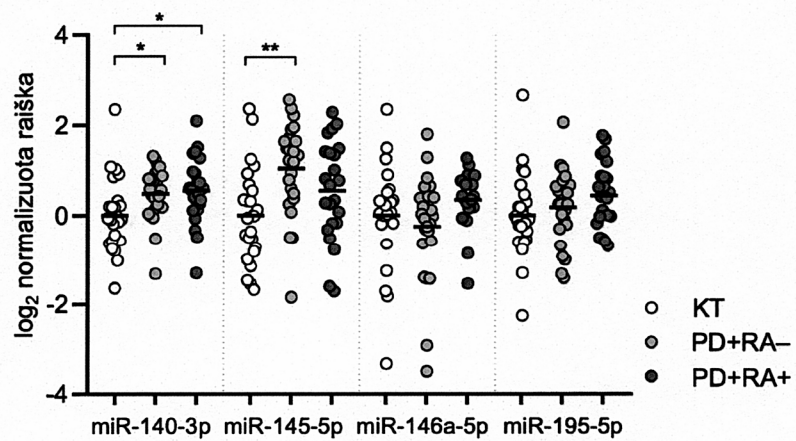
20. Fushimi S, Nohno T, Nagatsuka H, Katsuyama H. Involvement of miR-140-3p in Wnt3a and TGF β 3 signaling pathways during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Genes Cells*. 2018;23:517-27.
21. O'Leary L, Sevinç K, Papazoglou IM, Tildy B, Detillieux K, Halayko AJ, et al. Airway smooth muscle inflammation is regulated by microRNA-145 in COPD. *FEBS Lett* (2016) 590:1324–34. doi:10.1002/1873-3468.12168
22. Yang B, Kang X, Xing Y, Dou C, Kang F, Li J, et al. Effect of microRNA-145 on IL-1 β -induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett* (2014) 588:2344–52. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.033
23. He M, Wu N, Leong MC, et al. miR-145 improves metabolic inflammatory disease through multiple pathways. *J Mol Cell Biol*. 2020;12(2):152-162. doi:10.1093/jmcb/mjz015
24. Wang W, Yang L, Zhang D, Gao C, Wu J, Zhu Y, et al. MicroRNA-218 negatively regulates osteoclastogenic differentiation by repressing the nuclear factor- κ B signaling pathway and targeting tumor necrosis factor receptor 1. *Cell Physiol Biochem*. (2018) 48:339–47. doi: 10.1159
25. Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, et al. miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2 [retracted in: Nature. 2020 Jun;582(7810):134]. *Nature*. 2014;512(7515):431-435. doi:10.1038/nature13375
26. R. A. Irwandi, A. Vacharaksa. The role of microRNA in periodontal tissue: A review of the literature. *Arch Oral Biol*. 2016 Dec;72:66-74
27. Dorhoi A, et al. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J. Clin. Invest*. 2013;123:4836–4848. doi: 10.1172/JCI67604
28. Fordham, J., Guilfoyle, K., Naqvi, A. et al. MiR-142-3p is a RANKL-dependent inducer of cell death in osteoclasts. *Sci Rep* 6, 24980 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep24980>
29. Cheng P, Chen C, He HB, et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J Bone Miner Res*. 2013;28(5):1180-1190. doi:10.1002/jbmr.1845
30. Shao D, Wang C, Sun Y, Cui L. Effects of oral implants with miR-122-modified cell sheets on rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):1537-1544. doi:10.3892/mmr.2017.8094
31. Wang Z, Wu G, Feng Z, et al. Microarc-oxidized titanium surfaces functionalized with microRNA-21-loaded chitosan/hyaluronic acid nanoparticles promote the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:6675-6687. Published 2015 Oct 27. doi:10.2147/IJN.S94689
32. Wu K, Song W, Zhao L, et al. MicroRNA functionalized microporous titanium oxide surface by lyophilization with enhanced osteogenic activity. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5(7):2733-2744. doi:10.1021/am400374c
33. Song W, Yang C, Svend Le DQ, Zhang Y, Kjems J. Calcium-MicroRNA Complex-Functionalized Nanotubular Implant Surface for Highly Efficient Transfection and Enhanced Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(9):7756-7764. doi:10.1021/acsami.7b18289
34. Liu X, Tan N, Zhou Y, et al. Delivery of antagomiR204-conjugated gold nanoparticles from PLGA sheets and its implication in promoting osseointegration of titanium implant in type 2 diabetes mellitus. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:7089-7101. Published 2017 Sep 26. doi:10.2147/IJN.S124584
35. Andersen, M. O., Nygaard, J. V., Burns, J. S., Raarup, M. K., Nyengaard, J. R., et al. (2010) siRNA nanoparticle functionalization of nanostructured scaffolds enables controlled multilineage differentiation of stem cells. *Mol Ther*;18:2018-2027.

Apibrėžtis

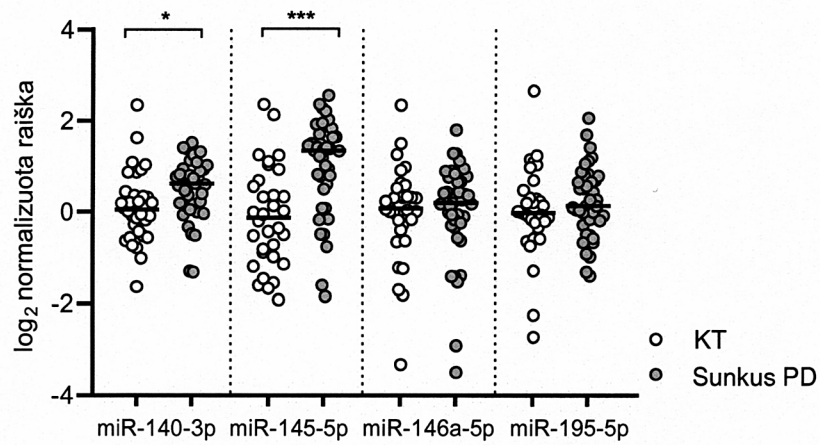
1. Titaninis dantų implantas, besiskiriantis tuo, kad jis yra sujungtas su atrinktų miRNR inhibitorių deriniu.
2. Titano implantas pagal 1 punktą, kur implantas yra perforuotas ir talpina liposomas.
3. Titano implantas pagal 1-2 punktus, kur liposomos dydis yra, pageidautina, nuo 25 iki 35 nM.
4. Titano implantas pagal 1-3 punktus, kur liposomos yra sujungtos su atrinktais miRNR inhibitoriais.
5. Titano implantas pagal 4 punktą, kur atrinkti miRNR inhibitoriai slopina atitinkamų miR-140-3p, -145-5p, -146a-5p ir -195-5p raišką.



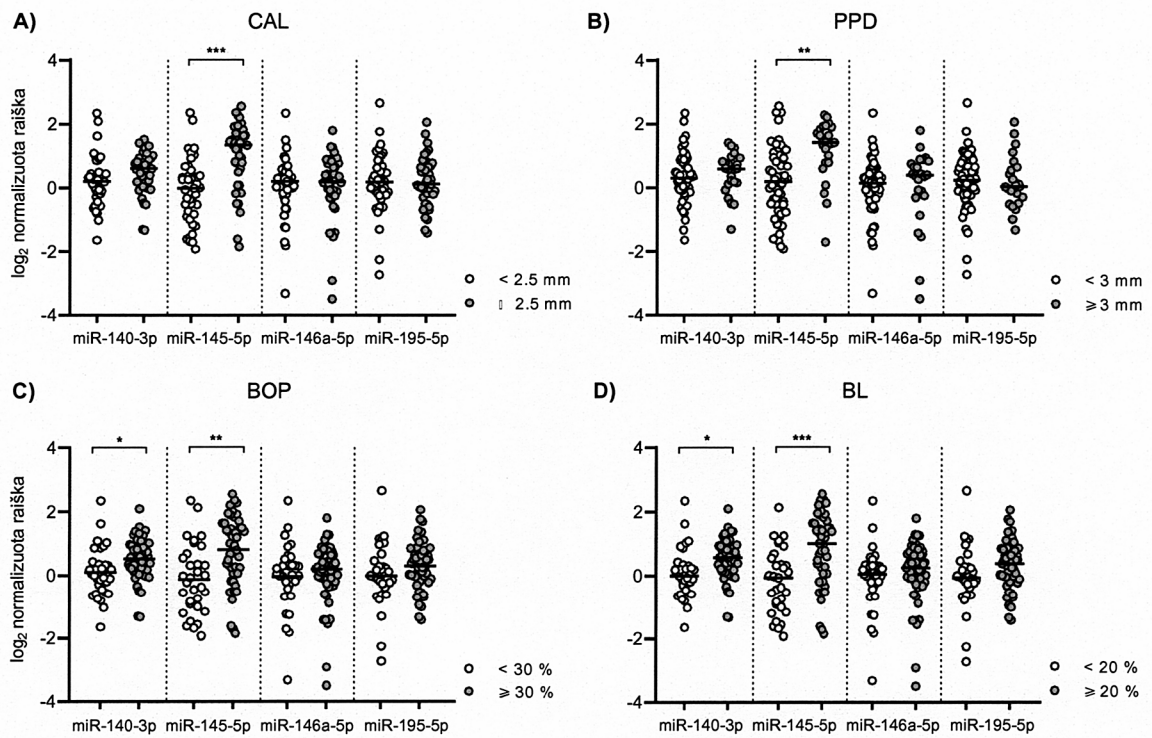
1 pav.



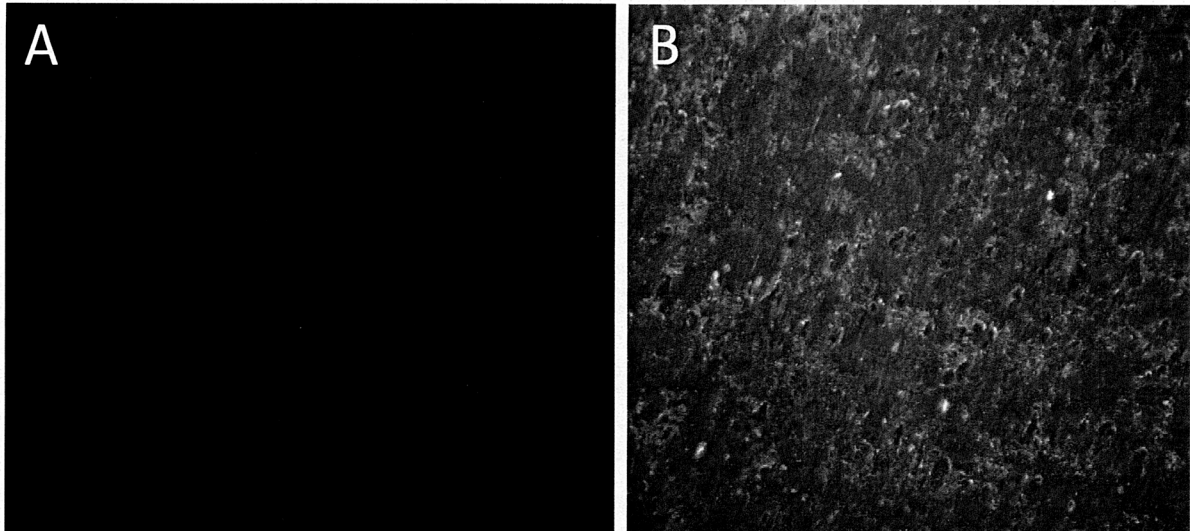
2 pav.



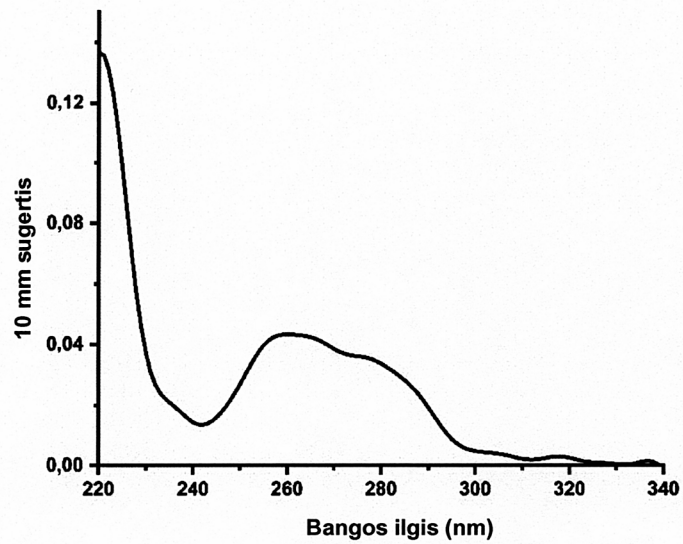
3 pav.



4 pav.



5 pav.



6 pav.

	1	2	3	4	5	6
A	NK	NK	NK	Liposomos	Liposomos	Liposomos
B	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai
C	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai
D	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai

7 pav.

	1	2	3	4	5	6
A	I	I	I	I	I	I
B	II	II	II	II	II	II
C	Liposomos	Liposomos	Liposomos	Liposomos	Liposomos	Liposomos
D	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai	Liposomos + miR inhibitoriai

 Titano diskai lygiu paviršiumi
 Perforuoti titano diskai

8 pav.