

**Българска академия на науките
Институт по експериментална морфология, патология и
антропология с музей**

БОЙКА ДИМИТРОВА АНДОНОВА-ЛИЛОВА

**"ПРОУЧВАНИЯ IN VITRO ВЪРХУ
ЦИТОСЪВМЕСТИМОСТТА И
ОСТЕОИНДУКТИВНОСТТА НА НОВИ МАТЕРИАЛИ ЗА
КОСТНИ ЗАМЕСТИТЕЛИ"**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
за придобиване на образователна и научна степен
„Доктор”

Област на висше образование:	4. Природни науки, математика и информатика
Професионално направление:	4.3. Биологически науки
Научна специалност:	Морфология (шифър 01.06.26)

Научен ръководител:
проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор

София, 2020

Представеният Дисертационен труд е написан на 242 стр. и съдържа 110 фигури и 18 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 153 заглавия, от които 10 на кирилица и 143 на латиница.

Експерименталната работа, свързана с изложените в представения дисертационен труд резултати, е извършена основно в лабораториите на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) - БАН. Част от изследванията са проведени в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев” – БАН и Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов” -БАН.

Калциево-фосфатните материали за костни импланти са синтезирани и физикохимически охарактеризирани от доц. Стефка Тапавичарова, доктор и доц. Диана Рабаджиева, доктор от Институт по обща и неорганична химия - БАН.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на разширено заседание на секция „Патология“, ИЕМПАМ-БАН, проведено (със заповед № РД-09-69 от 09.12.2020 г. Директора на Института) на 15.12.2020г.

Защитата на Дисертационния труд ще се състои на 31.03.2021г. от 11ч. в Заседателната зала на ИЕМПАМ-БАН (ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 25, София) на открито заседание на Научно жури, назначено със Заповед № РД – 15-4/ 14.01.2021г. на Директора на Института, в състав:

Материалите по защитата се намират на разположение на интересуващите се в Канцеларията на ИЕМПАМ-БАН (стая 209).

Издавам своята сърдечна благодарност на моя научен ръководител проф. Радостина Александрова, доктор, която с безкрайната си любов, страст и енергия на учител, прекрасен човек и приятел ме вдъхнови и ми разкри света на научната и изследователска работа. Изключително съм ѝ признателна, че през цялото време бе до мен, подкрепяше ме и ме съветваше и без нейната помощ настоящият дисертационен труд не би бил факт.

Благодаря на всички мои колеги и приятели от работния екип: гл. ас. Таня Живкова, доктор, ас. Лора Дякова, доктор, ас. Десислав Динев, доктор Абдулкадир Абудаллах, ас. Здравка Петрова, които много ми помагаша, подкрепяха ме морално и проявиха голямо разбиране, търпение и приятелство през всичките години на разработване на дисертационния труд.

Специални благодарности издавам към Ръководството на ИЕМПАМ-БАН - проф. Светлозара Петкова, доктор, проф. д-р Димитър Кадийски, дмн, проф. Нина Атанасова, дбн, проф. Машенка Димитрова, доктор, доц. Емилия Петрова, доктор осигурили всички необходими условия за ползотворна изследователска дейност.

Благодаря на колегите от ИЕМПАМ-БАН за колегиалността и разбирането. Специални благодарности към гл.ас. д-р Веселин Нанев, доктор и гл.ас. Ивелин Владов, доктор, за техническата помощ при работа с флуоресцентния микроскоп.

Сърдечно благодаря на проф. д-р Рени Калфин, доктор от Института по невробиология-БАН за ценните напътствия, отзивчивост и съвети по време на цялостната ми работа.

Благодаря на доц. Стефка Тепавичарова, доц. Диана Рабаджиева и техния невероятен екип от Института по обща и неорганична химия - БАН, за професионализма и приятелството, за ценните съвети и препоръки, които получих от тях, както и за предоставените ни за изследване материали за костни импланти от ново поколение.

Искрена благодарност към проф. д-р Марин Александров от ИЕМПАМ-БАН за помощта му при провеждане на цитопатологичните и морфологични анализи.

Издавам голяма благодарност към проф. Георги Милошев, доктор и доц. Милена Георгиева, доктор, от Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН, за оказаното съдействие при провеждането на молекулярно-биологичните тестове.

Искам да изкажа голяма благодарност и към нашите лаборанти - Светлана Влагова и Здравка Стоичкова, които винаги с голямо желание са ми помагали.

*Благодаря на моите скъпи родители, които винаги са вярвали в мен и са ме подкрепяли безусловно във всички мои начинания. Благодаря за търпението и любовта и подкрепата на съпруга ми и Ивет, благодаря на прекрасния му баща, който винаги със своята скромност и доброта ни оказваше нужната подкрепа - **на тях посвещавам настоящия дисертационен труд!***

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
II.	ЦЕЛ	10
III.	ЗАДАЧИ.....	10
IV.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	10
IV.1.	МАТЕРИАЛИ.....	10
	Химикали и консумативи.....	10
	Материали за костни заместители.....	11
	Експериментални модели.....	13
	Клетъчни култури	13
	А. Нетуморни клетки от човек и гризачи	13
	Б. Човешки туморни клетки.....	14
	Лабораторни животни	15
	Етични норми.....	15
IV.2.	МЕТОДИ.....	16
	Подготовка на пробите.....	17
	Работа с клетъчни култури.....	20
	Получаване на първични клетъчни култури и постоянни клетъчни линии	20
	Идентифициране на МСК	23
	1. Определяне на клетъчна жизненост	24
	3. Проучвания върху способността на веществата да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки	24
	4. Светлинна микроскопия и СЕМ анализ.....	25
	5. Статистическа обработка на експерименталните данни	25
	6. Обработка на снимковия материал	25
V.	РЕЗУЛТАТИ.....	25
	НОВОСИНТЕЗИРАНИ КАЛЦИЕВО-ФОСФАТНИ МАТЕРИАЛИ ОТ ГРУПА 1 – МОДИФИЦИРАНИ С ZN(II), MG(II) ИЛИ SR(II) ПРАХОВИ ОБРАЗЦИ	25
	V.1. Влияне върху преживяемост и пролиферативна активност на човешки и животински клетки	25
	V.2. Първични култури от костен мозък на мишка и плъх.....	33
	V.3. Първични клетъчни култури от костни експлантати на мишка.....	34
	V.4. Проучвания върху способността на КФМ от Група 1 да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки	35
	V.5. Изследвания върху генотоксичния ефект на КФМ от Група 1.....	37
	КАЛЦИЕВО-ФОСФАТНИ МАТЕРИАЛИ ОТ ГРУПА 2 –	38
	КОМПОЗИТНИ МАТЕРИАЛИ.....	38
	БИОСЪВМЕСТИМОСТ И ОСТЕОИНДУКТИВНОСТ НА МАТЕРИАЛИ ОТ ГРУПА 3 – ЦИМЕНТИ (АМОРФНИ КАЛЦИЕВИ ФОСФАТИ)	42
	V.6.1 Биосъвместимост при миши и човешки клетъчни линии	42
	Миши ембрионални фибробласти клетки и костномозъчни клетки.....	42
	Човешки нетуморни и туморни клетъчни линии.....	44
	Човешки мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан.....	53
VI.	ОБСЪЖДАНЕ	66
	Избор на експериментален модел	66
	Начин на подготовка на пробата	70
	Различна гъстота на засяване на клетките.....	72
	Прилагане на методи с различни клетъчни мишени и механизми на действие	72
	Материали от група 1 – Прахови образци	72
	Материали от група 2 – Композитни материали.....	75
	Материали от група 3 – Цименти	75
	Остеоиндуктивност.....	79
VII.	ИЗВОДИ	80

VIII. ПРИНОСИ	81
Оригинални.....	81
Приложни	82
Потвърдителни.....	82
IX. SUMMARY	82
X. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА	84
XI. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	88
XII. НАГРАДИ.....	90
XIII. БЛАГОДАРНОСТИ КЪМ НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ.....	90

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА

КТИ/КТМ -	Костно тъканно инженерство / Костно тъканно моделиране
МСК -	Мезенхимни стволови клетки
МТТ –	МТТ тест
ФТС –	Фетален телешки серум
ФСБ –	Фосфатно солеви буфер
КСЗ –	Костно-ставни заболявания
СЕМ-	Сканираща електронна микроскопия
СЗО -	Световна здравна организация
ТБС -	Тазобедрена става
АО/PI –	Комбинирано оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид
АСР -	Аморфен калциев фосфат
ЕСМ -	Извънклетъчен матрикс
CV –	Оцветяване с кристал виолет
NR –	Тест за включване на неутрално червено
РGP –	П – гликопротеин (P-glycoprotein)
SBF –	Симулирана телесна течност
ТВ –	Оцветяване с трипаново синьо
ТСР –	Трикалциев фосфат
АГ –	Апарат на Голджи
ЕПР –	Ендоплазматичен ретикулум
КФМ –	Калциево-фосфатни материали
ВЕС -	Клетъчна култура от костен експлант от мишка (Bone explant cells)
Mg – КФМ –	Модифицирани с Mg(II) йони КФМ
Zn – КФМ -	Модифицирани с Zn(II) йони КФМ
ТСР -	Трикалциев фосфат

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Костно-ставните заболявания (КСЗ) са сериозен здравен проблем, който силно влошава качеството на живот на страдащите и може да доведе до гибелта им. Те причиняват сериозни социални и икономически загуби и се нареждат сред водещите обществени предизвикателства на нашето време. Сред тях са дегенеративните и възпалителните процеси в областта на ставите и костите, костните фрактури, болките в областта на гърба и кръста, остеопорозата, сколиозата и други мускулно-скелетни патологии. Значението на КСЗ нараства с удължаването на продължителността на живота, а заедно с това и застаряването на населението, както и с обездвижването и затлъстяването – тенденции, които особено силно засягат икономически развитите страни, включително тези в Европа и САЩ. България е на пето място в света по процентен дял на възрастното население в рамките на общото население - 24.2% от населението на Република България е над 60 години. С по-високи показатели за процентен дял на възрастното население са само Япония, Италия, Германия и Швеция.

Достатъчно е да споменем, че през 2001 г. остеопорозата е обявена от Световната здравна организация (СЗО) за третото най-важно социално значимо заболяване след сърдечносъдовите и раковите заболявания. Американският институт по здравеопазване (National Institute of Health - NIH) определя остеопорозата като „костно увреждане, характеризиращо се с нарушена здравина на костите, предразполагащо индивида към повишен риск от фрактури“. Фрактурите поради повишена чупливост на костите вследствие на остеопороза засягат предимно гръбнака, бедрото и предмишницата. По данни на Българското дружество по ендокринология остеопорозата е причина за това след 50-годишна възраст една на всеки три жени и един на всеки пет мъже да получат до края на живота си най-малко една фрактура поради чупливост на костите. Счупването на тазобедрената става (ТБС) повишава с 10-20% смъртността в рамките на една година, а ¼ от пациентите с такива счупвания имат нужда от продължителен престой в болница. Само през 2010 г. около 22 милиона жени и 5.5 милиона мъже в страните на Европейския съюз са били диагностицирани с остеопороза, а броят на смъртните случаи поради остеопорозни фрактури е бил 43 000. В Чешката република от остеопороза са засегнати приблизително 7% от населението, което прави 700 000 души, годишно се документират по 50 000 остеопорозни фрактури. Според информация от Програмата за лечение на

остеопорозата в България, броят на засегнатите жени у нас е 750 000, а над 90 000 от тях вече имат по едно или повече счупвания на гръбначните прешлени. Годишно над 8 000 жени претърпяват счупване на ТБС и 4000 от тях загиват скоро след инцидента. Да не забравяме и за жертвите на катастрофи и бедствия, военни конфликти, наследствени заболявания и тумори.

Костите са известни с отличната си регенеративна способност и са единствената тъкан в човешкото тяло, която след травма може да възстанови (ако процесът на заздравяване протича без усложнения) напълно функцията си, при това (почти) без да остане „белег“.

В случаите, когато увредата е голяма и загубата на кост не може да бъде поправена по естествен път, възниква необходимост от използване на различни (постоянни, временни, биоразградими) медицински устройства за възстановяване на нарушената функционална активност на опорно-двигателния апарат.

Автоложното присаждане на кост (при което автографти се трансплантират от здрави върху увредени части на скелета на един и същи пациент) е възприето като златен стандарт при лечение на костни дефекти, тъй като поради липса на имунологична несъвместимост именно при тях би трябвало да се наблюдават оптимални резултати. Въпреки това, този тип лечение се съпътства от немалко проблеми, свързани със силно ограниченото количество тъкан, което може да бъде използвано за трансплантиране, както и с настъпващите допълнителни увреждания в тялото на пациента. Сред останалите сериозни недостатъци на тази процедура са трудностите при оформянето на присадката, за да се запълни костният дефект; необходимостта от провеждане на множество манипулации; дългият период на възстановяване; възможността от усложнения на мястото, откъдето е взет материалът за автотрансплантация.

При алоприсадките се извършва трансплантация на костен материал от един човек на друг, което също поражда редица трудности. Те се дължат не само на ограниченото количество костен материал, който може да бъде взет за присаждане, но също така и на реакциите на свръхчувствителност на организма към присадката, както и на възможността за предаване на инфекции

Съществуващите ограничения и трудности при използването на тези два терапевтични подхода налагат необходимостта от въвеждане на синтетични материали за костни заместители. През последните десетилетия бяха създадени редица продукти (керамики, метални сплави, биоактивни стъкла, полимери, композитни материали и

др.), които с различен успех намериха приложение в клиничната практика. Свързаните с използването им недостатъци обаче, с все по-голяма острота поставят въпроса за създаване на нови, усъвършенствани материали с добра биологична поносимост, остеокондуктивност и остеоиндуктивност; материали, чиито свойства се доближават в максимална степен до тези на функционално активната здрава кост и могат да бъдат успешно използвани за възстановяване на различни костно-ставни дефекти. Напоследък специален интерес предизвиква един нов подход – т.нар. тъканно инженерство, който съчетава прилагането на триизмерни матрици (3D скафолди) от биоматериали и култивирани в тях мезенхимни стволови клетки (МСК), чиято диференциация да бъде насочена към остеобласти и остеоцити, при което се създава реална възможност за ефективно регенериране на големи костни загуби. Интересът към МСК не е случаен. МСК са изключително ценни за костното тъканно моделиране благодарение на следните свои характеристики: висока пролиферативна активност, откриват се в различни тъкани на възрастните организми (включително костен мозък и мастна тъкан) и достъпът до тях е сравнително лесен, възможност за получаване на достатъчно количество, способността за диференциране в остеобласти и хондробласти, имуномодулиращи свойства, няма данни за тератогенен потенциал, липсват етични и юридически пречки за приложението им; тъй като са собствени клетки за пациента няма да предизвикат разгръщане на насочен срещу него имунен отговор.

Изследванията в тази иновативна област изискват провеждане на съвместни интердисциплинарни проучвания на специалисти от различни сфери на човешкото познание насочени към създаване на подходящи биоматериали за костни заместители и усъвършенстване на методите за манипулиране на мезенхимни стволови клетки, което без съмнение ще допринесе за превръщането на тази многообещаваща възможност в клинична реалност.

Водени от желанието да дадем своя, макар и съвсем скромнен принос, за осъществяването на тази благородна идея, с разработването на представения дисертационен труд ние си поставихме за цел да проведем проучвания върху цитосъвместимостта и остеоиндуктивната способност *in vitro* на 21 новосинтезирани калциево-фосфатни (КФМ) материали за костни заместители.

II. ЦЕЛ

Да се изследва цитосъвместимостта и остеоиндуктивната активност на модифицирани с метали [Mg(II) и/или Zn(II), Sr(II)] новосинтезирани калциево-фосфатни материали за костни заместители в човешки и животински клетъчни култури

III. ЗАДАЧИ

1. **Да се оптимизират условията** за оценяване на цитотоксичния ефект на изпитваните КФМ (въздействие върху клетъчна морфология, адхезионна способност, преживяемост и пролиферативна активност) при култивирани в лабораторни условия клетки в директни и индиректни експерименти, включително начин на приготвяне на пробата, гъстота на засяване на клетките, време на въздействие;
2. Да се изследва цитотоксичния и генотоксичния ефект на тестираните КФМ в култивирани в лабораторни условия **нетуморни и туморни човешки и животински (мишка, плъх, говедо) клетки** чрез провеждане на директни и индиректни експерименти с помощта на методи с различни мишени (клетъчни органели, молекули) и механизми на действие;
3. Да се проведат проучвания върху способността на КФМ (проявили обещаваща цитосъвместимост при предходните проучвания) да стимулират **остеогенната диференциация на човешки мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан** (т.нар. остеоиндуктивен ефект).

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

IV.1. МАТЕРИАЛИ

Химикали и консумативи

Използваната в проведените експерименти хранителна среда за клетъчно култивиране (Dulbecco's modified Eagle's medium, D-MEM) и феталният телешки серум са доставени от фирма Gibco-Invitrogen (Обединено кралство). Неутралното червено, кристал виолетът, пропидиевият йодид, акридин оранжът и трипсинът са получени от AppliChem (Германия); тиазол блу тетразолиум бромидът (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT), поли-L-лизинът, NaCl, РНАаза А, стандартната и нискотопящата се агароза са от Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия); Na₂HPO₄ и NaOH са от Merck (САЩ, Канада), разтворът на Alizarin red е от Merck (Германия). KCl е доставен от Riedel

de Haen (Honeywell, Румъния), а KH_2PO_4 е от Reanal Labor (Унгария). Антибиотиците (пеницилин, стрептомицин, метронидазол) за клетъчно култивиране са от Lonza (Белгия). Тетразолиева сол (MTS Assay Kit, Cell Proliferation, Colorimetric) и китът за определяне на алкална фосфатаза (Alkaline phosphatase colometric kit) са от Abcam (Обединено кралство). Хематоксилинът и еозинът, както и реагентите за определяне на пролиферативната активност на клетките чрез установяване на изявата на маркера за пролиферация Ki67 (Ready to Use Monoclonal Mouse Ab Clone MM1, Novolink Polymer detection system) са закупени от Leica (САЩ), колагеназата (Collagenase II) е от Genaxxon bioscience (Германия), формалдехидът е от Biognost (Република Хърватска). Хранителната среда за култивиране и диференциране на стволови клетки (с включени в нея антибиотици и антимикотици), както и твърдата хранителна среда за култивиране на микроорганизми са от HiMedia (India). Антителата за провеждане на флоуцитометричния анализ за определяне на фенотипа на човешките МСК са получени от BD Pharmingen (USA) – CD26; eBioscience (USA) – CD90, CD105, CD45, IgG1; Immunotool (USA) – IgG1 - допълнителна информация за тях е представена в Табл. 14.

Останалите химикали с висока степен на чистота са закупени от локални доставчици. Пластмасовата посъда за клетъчно култивиране (пипети, петритата, матрачетата, плаки, епруветки), както и филтърчетата ($0.22\ \mu\text{m}$) за стерилизиране на среди и разтвори, са доставени от Orange Scientific (Белгия). Предметните и покривните стъкла са от Silver Quality (Sigma) и ISOLAB microscope slide (Германия), използвани са и покривни стъкла Leica Premier Cover glass (USA)

Ензимът акутаза и феталният телешки серум Gold ни бяха предоставени безвъзмездно от Фирма IVD (Ай Ви Ди, България), за което им изказваме сърдечна благодарност.

Материали за костни заместители

За първи път са изследвани някои параметри на цитосъвместимостта и остеоиндуктивността *in vitro* на 21 новосинтезирани КФМ от три групи (Табл. 1):

- Прахови образци от модифицирани с метали $[\text{Mg}^{2+}$ и/или Zn^{2+} , $\text{Sr}^{2+}]$ калциевофосфатни материали – 8 броя (Група 1);
- Композитни материали – 6 броя (Група 2);
- Цименти – 7 броя (Група 3).

Изследваните от нас биоматериали и кратка характеристика за тях са представени в Табл. 1 и Фиг. 1

Табл. 1. Изследвани материали

Кодово наименование		Материал					Брой
Група 1: ПРАХОВИ ОБРАЗЦИ							
12A	Немодифицирани КФМ						1
Zn-3, Zn-7, Zn-13	Модифицирани с Zn ²⁺ йони						3
Mg-3, Mg-7, Mg-13	Модифицирани с Mg ²⁺ йони						3
D3	Модифицирани със Sr ²⁺ йони						1
Група 2: КОМПОЗИТНИ МАТЕРИАЛИ							
Състав, %	Ксантан	Желатин	Карагепан	Захароза	Вода	КФМ	6
W17	0.24	4.80		0.48	44.6	49.9	
W19	0.28	5.68	0.28		51.1	42.6	
W20	0.24	4.96	0.24	1.48	44.8	48.3	
W21	0.07	2.29		0.71	20.1	76.5	
W23	0.15	3.00	0.15		26.8	69.7	
W23GA	W23 обработен 24 ч с 1% разтвор на глутаралдехид						
Група 3: ЦИМЕНТИ							
АСР-ТА-18%	Цимент получен от АСР и 18% винена киселина						1
АСР-ТА-Mg-18%	Цимент получен от АСР и MgCl ₂ .6H ₂ O:MgO мол. отн. = 1:1 (5%) и 18% разтвор на винена киселина						1
АСР-ТА-Na-18%	Цимент получен от АСР и 18% разтвор на винена киселина с добавен Na ₂ HPO ₄						1
АСР-СА-5%	Цимент получен от АСР и 5% разтвор на лимонена киселина						1
АСР-СА-18%	Цимент получен от АСР и 18% разтвор на лимонена киселина						1
АСР-LA -18%	Цимент получен от АСР и 18% разтвор на млечна киселина						1
ТТСР	Цимент получен от ТТСР и 18% разтвор на разтвор на лимонена киселина, в който е разтворен Na ₂ HPO ₄ (молно съотношение ТТСР : Na ₂ HPO ₄ = 1:2).						1
Общо							21

Забележка: АСР = аморфен калциев фосфат; ТТСР = тетра калциев фосфат; КФМ – Zn (13 мол %) модифициран β -Три калциев фосфат, числото в скобата показва количеството на металните йони на Zn^{2+} и Mg^{2+} , които се съдържат в твърдата фаза на КФМ.



Фиг. 1. Представители на трите групи изпитвани вещества

Синтезирането и охарактеризирането на изследваните от нас калциево-фосфатни материали е осъществено от колектив от Института по обща и неорганична химия на БАН с ръководител доц. д-р Стефка Тепавичарова и доц. д-р Диана Рабаджиева.

Експериментални модели

Клетъчни култури

Експериментите бяха проведени с култивирани в лабораторни условия човешки и животински клетки с туморен и нетуморен произход (Табл. 2).

А. Нетуморни клетки от човек и гризачи

- Постоянна клетъчна линия Lер3 - фибробластoidни клетки получени от 3-месечен човешки ембрион;
- Клетъчна линия MRC-5 – диплоидни фибробласти от бял дроб на човек;
- VJ- фибробласти от кожа на новородено момче;
- Постоянна клетъчна линия BALB/c 3T3 – ембрионални миши фибробласти;
- Постоянна клетъчна линия MDBK - бъбрек от говедо
- Първични култури от костен мозък на мишка и плъх;

- Първични култури и постоянна клетъчна линия (BEC или Bone explant cells) от експланти от бедрена кост на мишка;
- Мезенхимни стволови клетки от костен мозък на мишка
- Мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан на човек (в експериментите са използвани клетки от 3 до 6 пасаж)

Б. Човешки туморни клетки

Клетъчна линия MCF-7 – получена от луминален тип А рак на млечната жлеза (клетките експресират рецептори за естроген и прогестерон, не експресират рецептора за епидермалния растежен фактор Her2);

- Клетъчна линия HeLa – карцином на шийката на матката;
- Клетъчна линия SAOS-2 - остеосаркомни клетки от 11-годишно момиче.

Първичните култури от костен мозък на мишка и плъх, както и първичните култури и клетъчната линия от костен експлант на мишка, са получени от нас. Постоянните клетъчни линии се съхраняват в Банката за клетъчни култури и вируси в ИЕМПАМ-БАН. Адипозната тъкан (отпаден продукт, отстраняван в хода на медицинските манипулации), от която бяха успешно изолирани човешки мезенхимни стволови клетки, беше предоставена от проф. д-р Мая Аргирова, доктор, от Клиника по изгаряне и пластична хирургия в УМБАЛСМ "Н.И.Пирогов".

Табл. 2. Клетъчни култури, използвани като моделни системи при проведените от нас експерименти

КЛЕТЪЧНИ ЛИНИИ						
Човешки		Говежди	Плъши	Миши		
Постоянни клетъчни линии	Първични култури	Постоянни клетъчни линии	Първични култури	Постоянни клетъчни линии	Първични култури	
НТ	Т	НТ	НТ	НТ	НТ	НТ
Lep 3	SAOS-2	МСК от адипозна тъкан	MDBK	Костен мозък	BALB/c 3T3	Костен мозък
MRC-5	HeLa					Костен 4 експлант
BJ	MCF-7					

НТ = нетуморни клетъчни линии; Т = туморни клетъчни линии; МСК = Мезенхимни стволови клетки

Лабораторни животни

Експериментите са проведени с плъхове от линия Wistar, мъжки, на възраст 1-3 месеца (общо 12 броя) и мишки от линия ICR от двата пола на възраст 1-3 месеца (общо 25 броя).

Животните бяха доставени от развъдната база на БАН (Институт по невробиология) в гр. Сливница. Настанени бяха (по не повече от 3-4 животни в клетка) в пластмасови кафези (с размери 40/52/ 18 см) и след едноседмична адаптация бяха включени в експерименти.

Животните бяха хранени със стандартна гранулирана храна за гризачи, като им беше осигурен свободен достъп (*ad libitum*) до водата и храната.

Етични норми

Всички експерименти с лабораторни животни бяха проведени при стриктно спазване на изискванията на Ветеринарномедицинските власти в България, които са в съзвучие с въведените в страните-членки на Европейския съюз Правила за отглеждане и работа с опитни животни. Броят на използваните лабораторни животни беше максимално ограничен, доколкото позволяват изискванията за получаване на статистически достоверни резултати.

По време на провеждане на експериментите с лабораторни животни Вивариумът на ИЕМПАМ-БАН е притежавал ветеринарно регистрационен номер 11130127 и разрешително № 96 по чл. 5, ал. 2 от Наредбата за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им (наредба 20) във връзка с чл. 155, ал. 1 от Закона за ветеринарномедицинската дейност (Към момента на предаване на дисертационния труд се намира в процес на презаверка на разрешителното).

Маснатата тъкан, от която са изолирани човешките мезенхимни стволови клетки, е отстранена като отпаден продукт в хода на медицински процедури.

IV.2. МЕТОДИ

Експериментална постановка

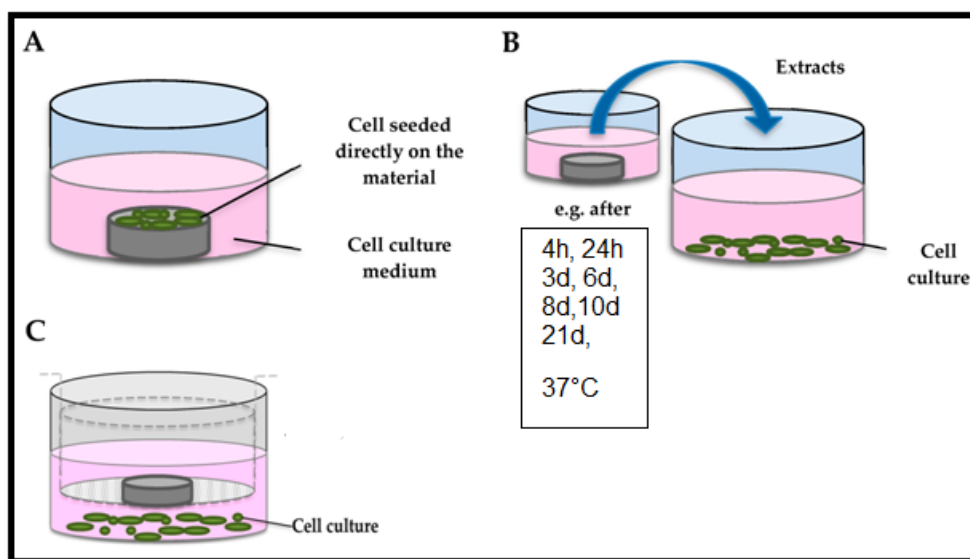
Проучванията върху цитосъвместимостта и остеоиндуктивността на изпитвания КФМ бяха проведени чрез 2 групи експерименти (Фиг. 2) – директни и индиректни.

- **Директни експерименти** – при тях клетките се култивират директно върху повърхността на материала. За тази цел материалите бяха изработени под формата на пластина („хапче“), която плътно прилягаше на дъното на ямката за клетъчно култивиране (48-ямкови плаки) Фиг.1. Такива експерименти бяха проведени с растящи в монослой клетъчни култури и материали от Група 3.

- **Индиректни експерименти** – при осъществяването им клетките бяха култивирани:

В присъствие на материала (под формата на „топчета“ и „спагети“, Фиг. 1), каквито бяха материалите от Групи 2 и 3. Подобни експерименти бяха проведени основно с растящи в суспензия костномозъчни клетки от гризачи;

В среда, която предварително е инкубирана в присъствие на изпитвания материал (най-често в продължение на 4 часа) – т.нар. модифицирана с КФМ среда (КФМ среда). Такива експерименти бяха проведени с материалите и от трите групи и растящи в монослой или суспензия клетъчни култури.



Фиг. 2. Схематично представяне на директни и индиректни експерименти

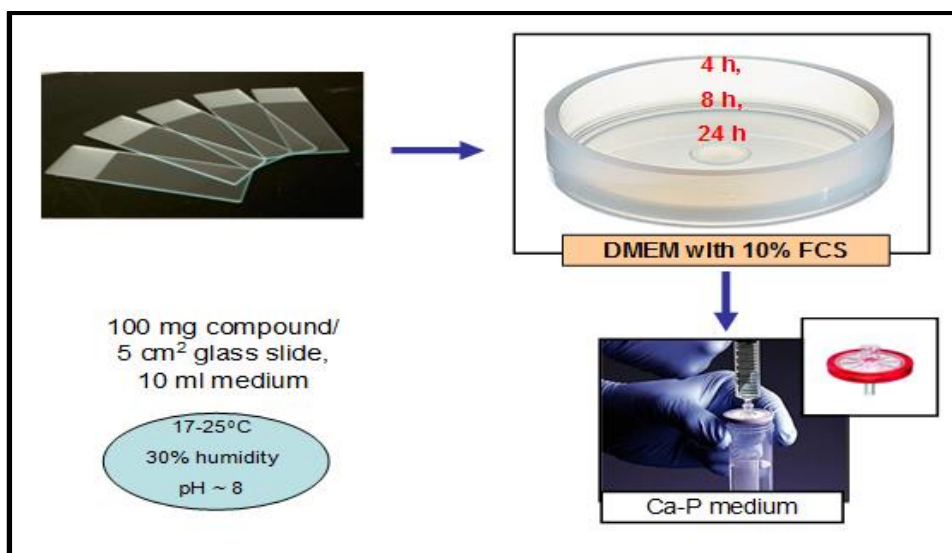
(по Scarcello, Dominique Lison, 2019)

- А - директен експеримент, включващ директен контакт между клетките и материала,
- В - третиране на клетките с модифицирана среда, получена след определено време на предварително инкубиране на материала в нея
- С - Култивиране на клетките в присъствие на материала, но не върху неговата повърхност

Подготовка на пробите

Подготовка на материалите от Група 1 – Прахови образци

От всеки материал се измерваха (на аналитична везна OHAUS standard) по 100 mg. Те се смесваха с 0.33 ml дестилирана вода и се разстилаха равномерно с помощта на зъболекарска шпатула върху грапавата повърхност на предметно стъкло (ISOLAB microscope slide) върху площ от 5 cm² (2.0 cm x 2.5 cm). Пробите се оставяха за 30 min на стайна температура, за да изсъхнат, след което всяко стъкло с нанесен върху него слой материал се пренасяше в петри (10 cm) и към него се добавяше 10 ml среда DMEM, съдържаща 10% фетален телешки серум (ФТС) и антибиотици. Следваше инкубация на пробите в термостат при температура 37°C за 4 (най-често), 8 или 24 часа. След изтичане на инкубационния период, така модифицираната с изпитваните КФМ среда се филтрираше най-напред с хартиен филтър (FILTRAK), а след това с филтър с големина на порите 0.2 µm. Подготовката на пробите се провеждаше при температура 17-25 °C и влажност на въздуха 30%, а рН на пробите беше ~ 8. По този начин беше получена т.нар. 100% модифицирана с КФМ среда (100% КФМ) (Фиг. 8). В някои от експериментите тя беше смесвана с немодифицирана среда в съотношение 3 : 1, 1 : 1 и 1 : 3 (vol. : vol), при което бяха получени среди със съдържание на КФМ съответно 75% (75% - КФМ), 50% (50% - КФМ) и 25% (25% - КФМ).



CaP medium = 100% модифицирана с КФМ среда

Фиг. 3. Схематично представяне на подготовката на калциево-фосфатните материали от Група 1 – Прахови образци, за провеждане на експериментите

Подготовка на материалите от Група 2 – Композитни материали

От всеки материал се измерваха (на аналитична везна OHAUS standard) около 30 mg. Съответното вещество се стерилизирано на УВ светлина за 2 часа. Добавяше се хранителна среда DMEM, съдържаща антибиотици и 10% ФТС (при клетките от линии Lер3, BALB/c 3T3) и 20%ФТС (при културите от костномозъчни клетки и клетки от костни експланتي), количеството на хранителната среда се изчислявана спрямо теглото на материала: на 50mg - 2000 µl среда. Инкубацията на материала в средата продължаваше различен период от време (най-често 4 часа), след което беше филтрирана с филтър с големина на порите 0.2 µm. Подготовката на пробите се провеждаше при температура 25 °C и влажност на въздуха 30%-50%..

Подготовка на материалите от Група 3 – Цименти

За оценяване на цитотоксичността и остеоиндуктивната активност на тези вещества бяха проведени две групи експерименти: **индиректни** – клетките бяха култивирани в КФМ среда, в която материалите бяха предварително инкубирани за различни периоди от време (1 - 21 дни) или в присъствието на самите материали; **директни** (при които клетките бяха посявани върху самите материали) за период от 1-6 дни.

Индиректни експерименти

Предварително стерилизираните материали бяха поставяни в ямки от 12- , 24- или 48 -ямкови плаки (0,8mg - 1mg до 2 mg вещество). В зависимост от начина на растеж на клетките беше подхотдено по два начина:

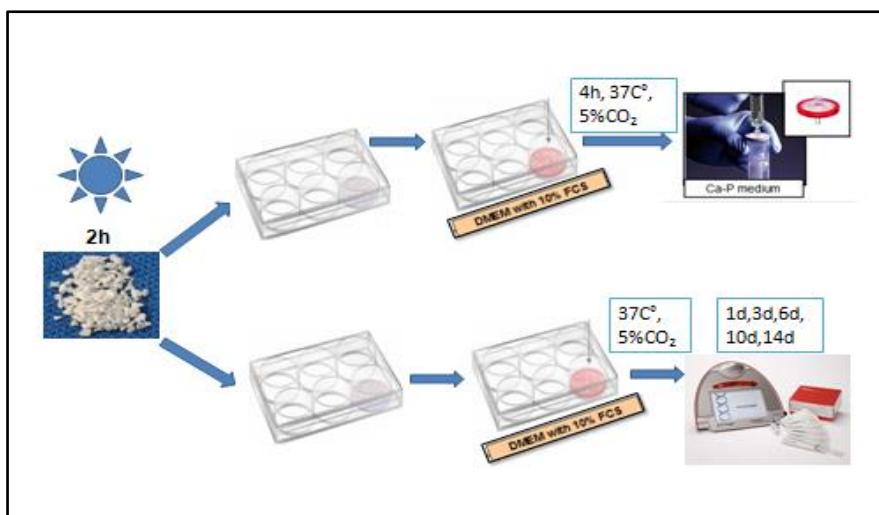
- за постоянни монослойни клетъчни линии - материалите бяха инкубирани в хранителна среда DMEM с 10% ФТС за определен период от време –1, 3, 6, 10, и 21 дена. По този начин беше получена т.нар. модифицирана хранителна среда, в която клетките бяха култивирани от 72 до 144 часа и 21 дена (само за МСК), а преживяемостта им беше оценявана чрез МТТ и/ или МТС тест и/или NR метод.

- за първични суспензионни клетъчни култури - Клетките и материалът се инкубираха заедно, като броят и преживяемостта на клетките се определяха чрез автоматичен електронен брояч (Invitrogentm, Countesstm, Automated Cell Counter) след оцветяване с трипаново синьо. От всеки материал се измерваха (на аналитична везна ОНАUS standard) около 30 mg. Съответното вещество беше стерилизирано на УВ светлина за 2 часа. Беше добавяна среда DMEM с 20%ФТС (БЕС, КМК) и антибиотици, която беше изчислявана спрямо теглото на материала по формула 50mg на 2000 µl. След това живите клетки бяха изброявани на различни интервали от време (1-17дни) по описания по-горе начин.

В някои от случаите костномозъчните клетки се центрофугираха, след което се ресуспендираха в КФМ среда. Преживяемостта им се определяше с автоматичен електронен клетъчен брояч (Invitrogentm, Countesstm, Automated Cell Counter, до 6 дни). При тези експерименти при получаването на КФМ среда се използваше съотношението 50mg вещество - 2000 µl хранителна среда.

Директни експерименти

Материалите се стерилизираха чрез УВ облъчване в продължение на 2 часа до 2 дни (при ТТСР). Клетките се посяваха върху повърхността на стерилните материали в 48-ямкови плаки. Материалът във всяка ямка беше около 0.7 – 0.8 mg; - 1gr, а в някои експерименти – 2 gr (съгласно ISO standard 10993 от 2009/2012/2018 г). Всеки материал имаше собствена Контрола - Материал (Материал и среда с 10% ФТС, без клетки). Преживяемостта/пролиферативната активност на клетките се оценяваше чрез МТТ и/или МТС тест и/или метод за включване на неутрално червено (NR тест) на различни интервали от време (1-3-6 дни).



Фиг. 4. Схематично представяне на подготовката на калциево-фосфатните материали за провеждане на експериментите (Композитни материали и Аморфни калциеви фосфати)

Работа с клетъчни култури

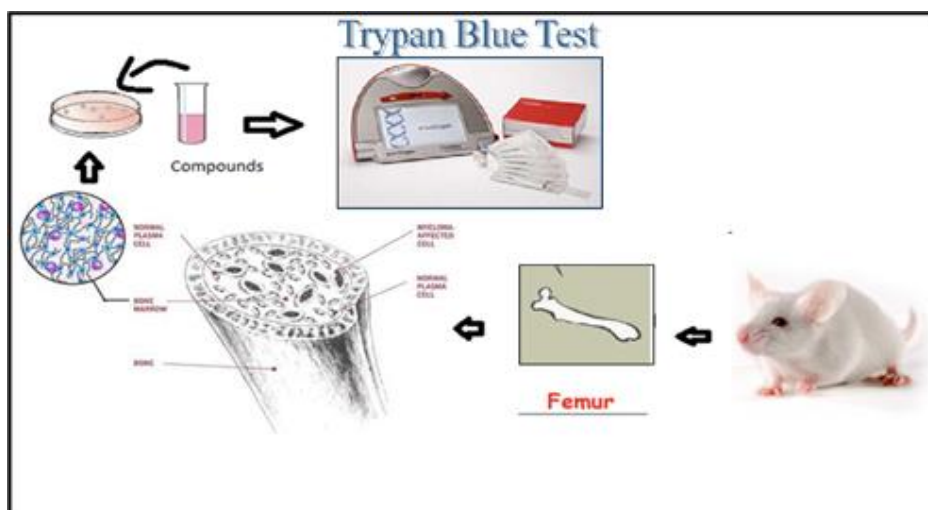
Получаване на първични клетъчни култури и постоянни клетъчни линии

- Първични клетъчни култури от костен мозък на мишка и плъх

Костномозъчните клетки бяха изолирани при асептични условия от *femur* на безболезнено убити лабораторни животни (мишка, плъх). Едноклетъчната суспензия беше получена чрез неколkokратно пасиране със стерилна хирургическа игла (G24). По-нататък следваше центрофугиране (1000 об/мин, 10 мин, Hettich ROTIXA / K) в хранителна среда без серум (2 пъти) и с 20% ФТС (веднъж).

Броят и жизнеността на костномозъчните клетки бяха определени с помощта на клетъчен брояч (Invitrogentm, Countesstm, Automated Cell Counter) чрез теста за оцветяване с трипаново синьо.

На Фиг. 5 е представен схематично процесът по изолиране на костно-мозъчни клетки от бедрена кост на мишка (плъх), култивирането и отчитането на преживяемостта/пролиферативната активност.



Фиг. 5. Изолиране, култивиране и определяне на преживяемостта/пролиферативната активност на костно-мозъчни клетки от гризачи (Схематично представяне)

- Клетъчни култури / постоянна клетъчна линия от експланти от бедрена кост на мишка

Бедрената кост на безболезнено убитото опитно животно беше внимателно отпрепарирана, след което бяха отстранени двете епифизи. Диафизата беше разрязана на две и всяка една от двете частици беше инкубирана върху капка серум в ямка от 12-ямкова плака в продължение на 1 час при стайна температура, след което беше добавена внимателно среда с 20% ФТС и антибиотици. Една от получените по този начин клетъчни култури успешно премина 60 пасажа и в момента се съхранява в замразено състояние (при -196°C) в клетъчната банка на ИЕМПАМ-БАН. Означена е като постоянна клетъчна линия ВЕС.

- Изолиране и култивиране на мезенхимни стволови клетки от костен мозък на мишка

В опитите за изолиране на мезенхимни стволови клетки беше следвана описаната от Soleimani и Nadri (2009) процедура. Накратко, след изолирането на костния мозък, клетките бяха засявани и култивирани в 24-ямкови плаки с гъстота 10×10^6 , 5×10^6 , 3×10^6 , 2×10^6 и 1×10^6 в хранителна среда с 20% ФТС. Изолирането и по-нататъшното култивиране на клетките е обобщено в Табл. 3.

Табл.3. Опит за изолиране и култивиране на мезенхимни стволови клетки от мишка.

Ден/Интервал	Дейности
Ден 0 – Начало на експеримента	Изолиране на бедрена кост от експериментално животно; изрязване на епикондилите, трикратно промиване с 2 мл среда без серум на костно-мозъчния канал. Клетките се изброяват, Получената клетъчна суспензия се центрофугира трикратно и се засява в различни гъстоти (10×10^6 , 5×10^6 , 3×10^6 , 2×10^6 и 1×10^6) в 12-ямкова плака в присъствие на среда с 20% ФТС
1-3 ден – през 8 часа	Смяна на средата без промиване
4-7 ден на 24 часа	Смяна на средата след промиване със среда без серум
8-40 ден, през 7 дена	Смяна на средата след промиване със среда без серум
40 ден	Пасиране с акутаза след двукратно промиване със среда без серум
54 ден	Пасаж с акутаза и размножаване на клетките (между пасажите средата се сменя частично на 5-7 дена)
67 ден	Пасаж с акутаза в същата ямка (между пасажите средата се сменя частично на 5-7 дена)

- Изолиране и култивиране на мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан на човек

А. Изолиране на мезенхимни стволови клетки от аспират от адипозна тъкан

Клетките от аспирата се прехвърляха в 50ml центрофужна епруветка, след което бяха центрофугирани двукратно (1100 об/мин, 10 мин, Hettich ROTIXA / К). Получени бяха три слоя: горен (от мастна тъкан), среден (клетъчна суспензия, в която са и интересоващите ни МСК) и долен (утаени на дъното еритроцити). Средният слой (клетъчната суспензия) беше внимателно събран с помощта на пипета и прехвърлен в нова епруветка. Броят и преживяемостта на клетките бяха определени с автоматичен електронен брояч (Invitrogentm, Countesstm, Automated Cell Counter) чрез оцветяване с трипаново синьо. Добавени бяха 100 µl разтвор на NH_4Cl и KHCO_3 (8.26 g NH_4Cl , 1 g KHCO_3 и 0.037 g EDTA pH 7.3 до 1L ddH₂O) и беше осъществено центрофугиране при същите условия (1100 об/мин, 10 мин, Hettich ROTIXA / К). След отстраняване на супернатантата, утаените клетки бяха ресуспендирани в хранителна среда DMEM, съдържаща 10% ФТС и 2x антибиотици, с посети в (6-ямкова) плака за клетъчно култивиране.

Б. Изолиране на мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан

Клетките от адипозна тъкан (две парчета тъкан с големина 4:4 cm и 5:5 cm, всяко едно от които по-нататък беше самостоятелно обработвано) са изолирани чрез стандартна процедура. Най-напред с помощта на стерилен скалпел (номер 11) и пинсета, тъканта беше раздробена на малки парченца, които бяха разпределени по равно в четири

центрифужни епруветки (50мл). Към всяка епруветка бяха добавени по 3 ml разтвор на 0,075% колагеназа (да покрие парченцата) и пробите бяха оставени за 1 ½ - 2 часа в термостат при 37°C. В резултат се получиха три слоя клетки: горен (мастен), среден (клетъчна суспензия) и долен (от кръвни клетки). Средният слой (клетъчната суспензия) беше внимателно събран и прехвърлен в нова центрофужна епруветка (50 мл), добавени бяха 100µl разтвор на NH₄Cl и KHCO₃ (8.26 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ и 0.037 g EDTA pH 7.3 до 1L ddH₂O) и беше проведено ново центрофугиране (1100 об/мин, 10 мин, Hettich ROTIXA / K). След отстраняване на супернатантата, утаените клетки бяха ресуспендирани в хранителна среда DMEM, съдържаща 10% ФТС и 2X антибиотици. Броят и жизнеността на клетките бяха определени с клетъчен брояч (Invitrogentm, Countesstm, Automated Cell Counter) чрез оцветяване с трипаново синьо. Клетъчната суспензия беше прехвърлена в матрчета и плаки за клетъчно култивиране.

Протоколът за изолиране на човешки МСК от адипозна тъкан е представен схематично на Фиг. 6.

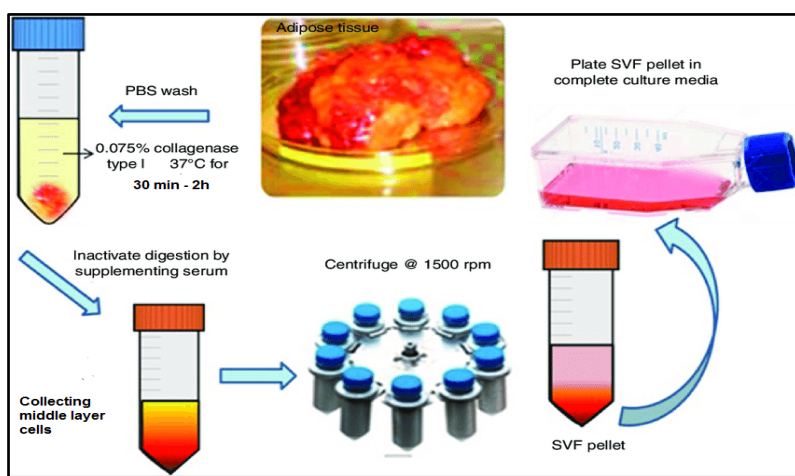
Идентифициране на МСК

Проведен беше флоуцитометричен анализ за охарактеризиране на фенотипа на човешките стволови клетки от адипозна тъкан. Клетките бяха трипсинизирани и промити чрез центрофугиране (двукратно на 1100 оборота за 10 мин, Hettich ROTIXA / K), след това беше добавена среда с 10%ФТС и суспензията от единични клетки беше оцветена с белязани с флуорохром антитела, разпознаващи човешки CD29, CD90, CD105, CD45, IgG1. Проучването беше осъществено чрез апарат за проточна цитометрия BD FACSCaliburTM (BD Biosciences), а резултатите бяха анализирани с помощта на Cell Quest software (BD Biosciences).

Охарактеризирането на МСК е проведено в Института по биология и имунология на размножаването "Акад. Кирил Братанов" - БАН с любезното съдействие на доц. Милена Мурджева, доктор.

Табл 4. Маркери използвани за доказване на стволовите (МСК) характеристики на клетките, изолирани от човешка мастна тъкан

Антитяло	Клон	Флуорохром	Производител
CD29	MAR4	Фикоеретрин (PE)	BD Pharmingen
CD90	eBio5E10	FITC	eBioscience
CD105	SN6	Фикоеретрин (PE)	eBioscience
CD45	2D1	FITC	eBioscience
IgG1	203	FITC	ImmunoTools
IgG1	P3.6.2.8.1	Фикоеретрин (PE)	eBioscience



Фиг. 6. Схематично представяне на протокола за изолиране на мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан (Tanya Debnath et al.2018)

1. Определяне на клетъчна жизнестойност

2.1. Тест за оцветяване на мъртвите клетки с трипаново синьо - с електронен брояч (Invitrogen™, Countess™, Automated Cell Counter)

2.2. Определяне влиянието на вещества върху клетъчната преживяемост

2.2.1. MTT тест (MTT) / MTS тест

2.2.2. Тест за включване на неутрално червено (Neutral red uptake cytotoxicity assay - NR)

2.2.3. Оцветяване с кристалвиолет (CV)

3. Проучвания върху способността на веществата да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки

3.1. Влияние на вещества върху клетъчния монослой

- 3.2. Оцветяване на клетки с хематоксилин и еозин (HE)
- 3.3. Оцветяване на клетки с акридин оранж (АО) и пропидиев йодид (PI)
- 3.4. Оцветяване на клетките с Ализарин ред
- 3.5. Имунохистохимично изследване за доказване експресията на ядрен протеин Ki-67
- 3.6. Изследвания върху способността на веществата да предизвикват двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите - *Single Cell Gel Electrophoresis* ("Comet assay") при неутрално рН (за доказване на двойноверижни скъсвания в ДНК)
- 4. Светлинна микроскопия и СЕМ анализ**
- 5. Статистическа обработка на експерименталните данни**
- 6. Обработка на снимковия материал**

V. РЕЗУЛТАТИ

НОВОСИНТЕЗИРАНИ КАЛЦИЕВО-ФОСФАТНИ МАТЕРИАЛИ ОТ ГРУПА 1 – МОДИФИЦИРАНИ С ZN(II), MG(II) ИЛИ SR(II) ПРАХОВИ ОБРАЗЦИ

V.1. Влияне върху преживяемост и пролиферативна активност на човешки и животински клетки

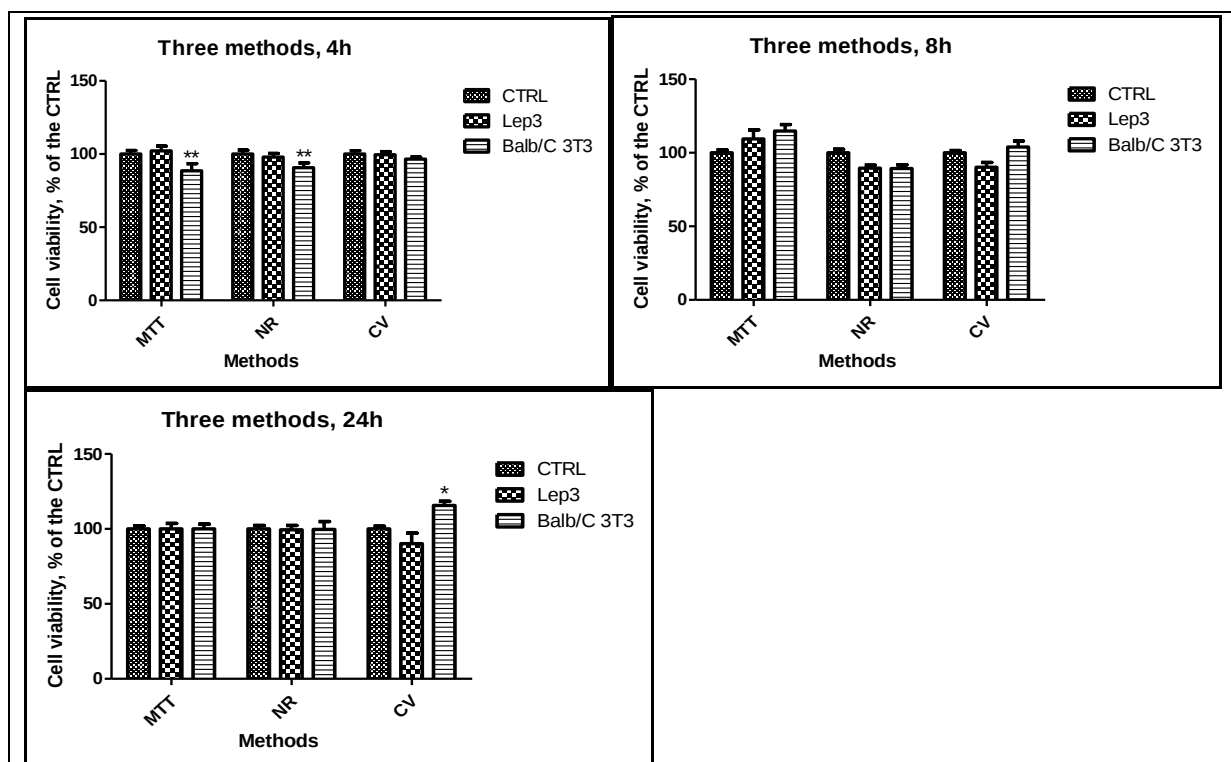
При подготовката на представения Дисертационен труд бяха осъществени различни групи експерименти (накратко обобщени в Табл. 5), с които целяхме да получим първоначална информация за цитотоксичния ефект на изпитваните КФМ от Първа група върху култивирани в лабораторни условия човешки и животински клетки, като в същото време оптимизираме условията за провеждане на подобен род изследвания в нашата лаборатория. Всички проведени експерименти бяха индиректни (Виж. т. IV.2 и Фиг. 2, Раздел «Материали и Методи»), т.е. клетките от използваните като моделни системи култури бяха култивирани в модифицирана хранителна среда (КФМ среда, в която съответният материал беше инкубиран за определен период от време – най-често 4 часа) или в присъствие на материала.

Табл. 5. Групи експерименти, проведени при подготовката на представения Дисертационен труд

ГРУПА	ЕКСПЕРИМЕНТ
А	Едновременно провеждане при еднакви условия на цитотоксични тестове (MTT, NR, CV, TB) с различни клетъчни мишени и механизми на действие.
В	Установяване на потенциалната цитотоксичност на проби – КФМ среда, в която материалът е инкубиран в продължение на 4, 8 и 24 часа
С	Сравняване на преживяемостта и растежния потенциал на засети с различна начална гъстота клетки – 2×10^6 , 1×10^6 , 0.5×10^4 , 0.25×10^4 клетки/96-ямкова плака
Д	Сравняване на клетъчната преживяемост след различен период на култивиране в присъствие на модифицирана с КФМ среда – 72, 96, 120 и 144 часа
Е	Сравняване влиянието на модифицирана с КФМ хранителна среда – наречена още 100% среда и хранителна среда съдържаща съответно 75%, 50% и 25% от тази модифицирана (100%) среда.

При проведените от нас експерименти беше изследвано влиянието на изпитваните материали върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки от линии Lep3 (фибробластoidни клетки от 3-месечен човешки ембрион), MRC-5 (диплоидни човешки ембрионални клетки) и BALB/c 3T3 (ембрионални миши фибробласти). Получените резултати са обобщени на Фигури 7-10 и Табл. 6.

Тези резултати бяха потвърдени при провеждането на MTT тест, тест за включване на неутрално червено и оцветяване с кристалвиолет (Фиг. 6). За илюстрация на Фиг. 6 са представени данните, получени с трите цитотоксични теста (MTT, NR, CV) при клетки от линии Lep3 и BALB/c 3T3, култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на среда, модифицирана за 4, 8 и 24 часа в присъствие на Mg 7.

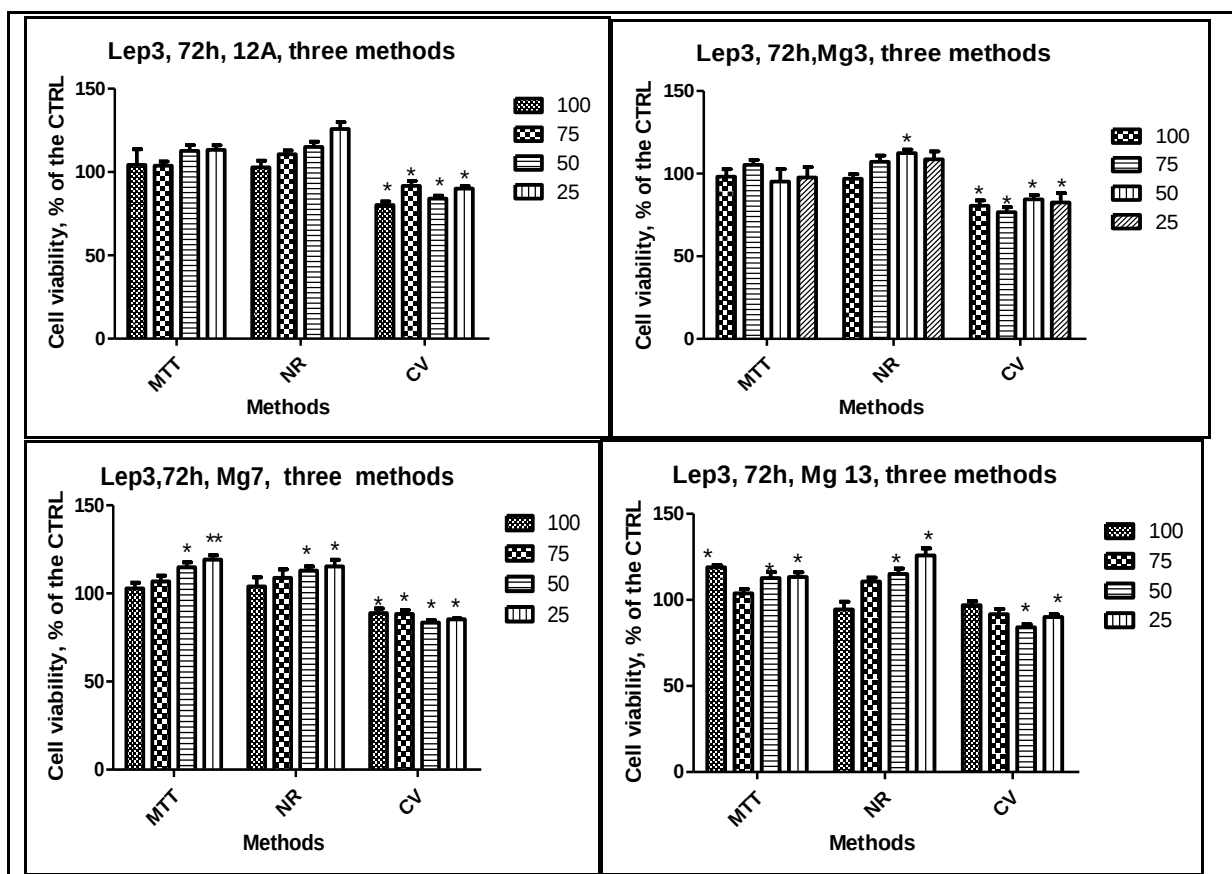


Фиг. 7. Влияние на Mg7 върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки от линии Lep3 и BALB/c 3T3. Клетките са засети с гъстота 1×10^6 клетки / 96 ямкова плака и са култивирани в продължение на 72 часа в 100% модифицирана среда, получена след предварително инкубиране на Mg3 в нея за 4, 8 и 24 часа. Клетъчната преживяемост е отчетена с помощта на MTT тест (MTT), метод за включване на неутрално червено (NR), оцветяване с кристал виолет (CV). Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Neuman Kaul, с GraphPad Prism v.5.0. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$); CTRL = Контрола.

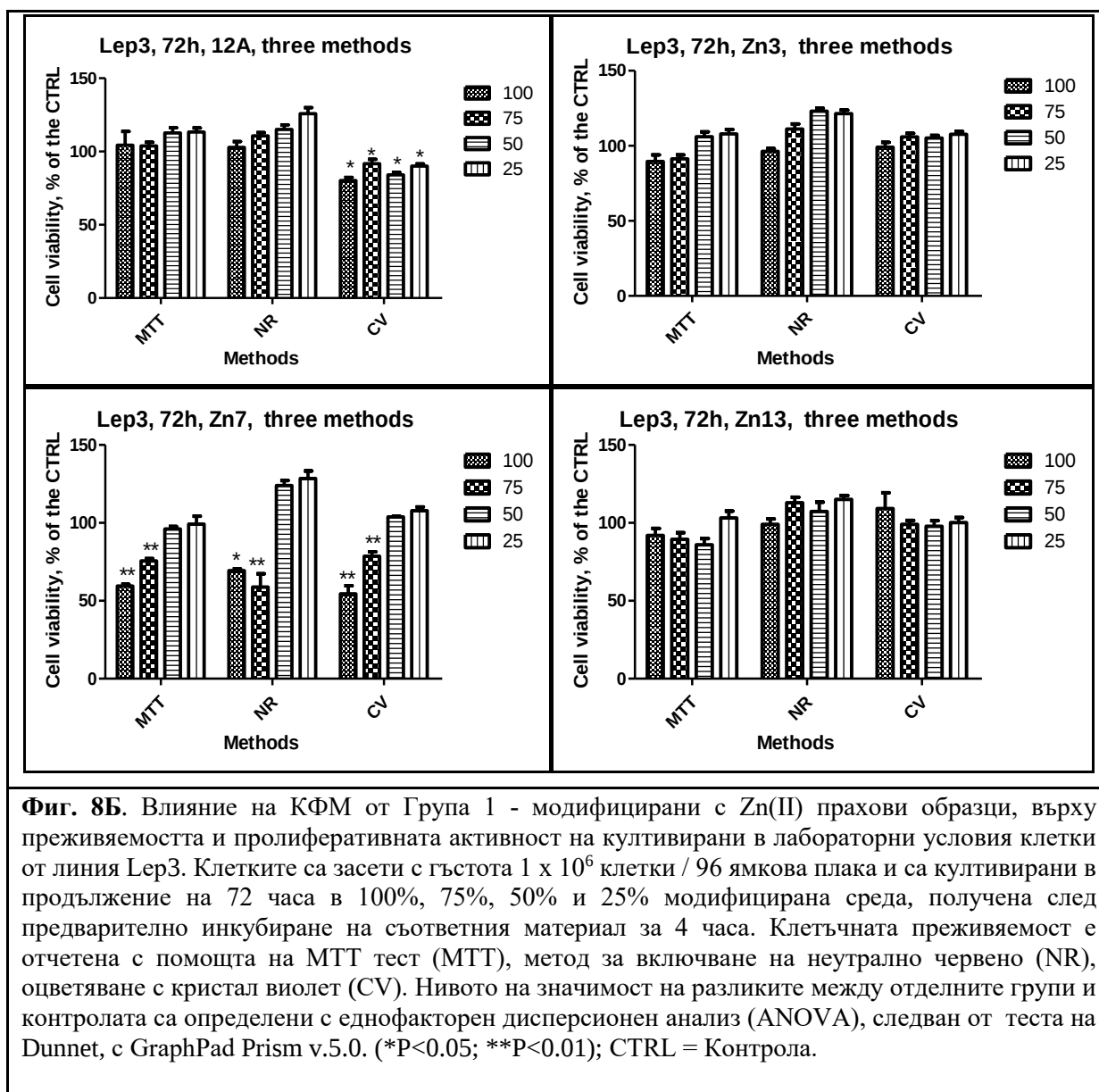
При използването на 100% модифицирани с КФМ среди, които са инкубирани в продължение на различни периоди от време (4, 8, 24 часа) в присъствие на съответните калциево-фосфатни материали, бяха получени сходни резултати (Фиг. 7). Това беше причината при останалите експерименти да използваме среда, инкубирана 4 часа с КФМ.

Беше сравнено влиянието на модифицирана с КФМ хранителна среда (наречена още 100% КФМ среда) и хранителна среда, съдържаща съответно 75%, 50% и 25% от тази модифицирана (100%) среда. Като цяло, с увеличаване на концентрацията на модифицираната с КФМ среда преживяемостта на третираните кретки намалява, но остава сравнима с контролата.

Както вече беше показано при работа със 100% КФМ среда, и тук, при различните концентрации, съяо така при нарастването на гъстотата на засетите клетки процентът на живите клетки спрямо контролата остана сравнима (Фиг. 7-9).



Фиг. 8А. Влияние на КФМ от Група 1 - модифицирани с Mg(II) прахови образци, върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки от линия Lep3. Клетките са засети с гъстота 1×10^6 клетки / 96 ямкова плака и са култивирани в продължение на 72 часа в 100%, 75%, 50% и 25% модифицирана среда, получена след предварително инкубиране на съответния материал за 4 часа. Клетъчната преживяемост е отчетена с помощта на MTT тест (MTT), метод за включване на неутрално червено (NR), оцветяване с кристал виолет (CV). Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от теста на Dunnet, с GraphPad Prism v.5.0. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$); CTRL = Контрола.

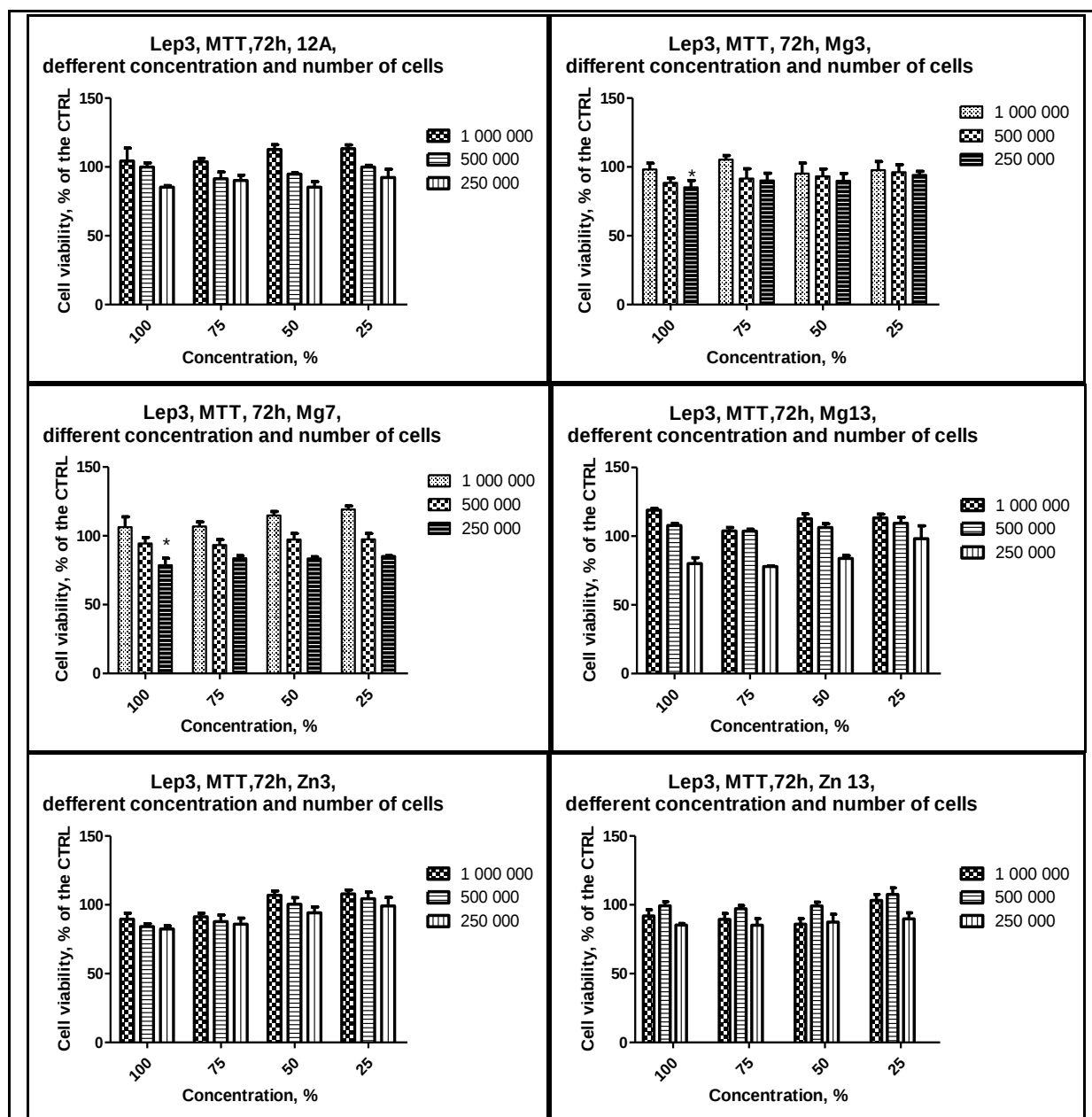


При засяването на клетките с различна начална гъстота (2×10^6 (за тази гъстота на клетките, данните не са показани); 1×10^6 ; 5×10^5 ; 2.5×10^5 клетки / 96-ямкова плака за клетъчно култивиране), с намаляване на началната гъстота на клетките се наблюдаваше известно намаляване на процента на живите клетки спрямо контролата, като в някои случаи тези разлики бяха статистически достоверни ($p < 0.05$, Виж Фиг.9). Така например процентът на живите човешки ембрионални клетки от линия Lep3, култивирани за 72 часа в среда, инкубирана в продължение на 4 часа в присъствие на Mg3, Mg7 и Mg13 (спрямо контролата) е както следва: $88.445\% \pm 3.378$, $78.713\% \pm 4.979$ и $80.104\% \pm 4.160$, когато гъстотата на засяване е 2.5×10^5 клетки / плака. Тези стойности са съответно $107.666\% \pm 3.487$ (Mg3), $105.164\% \pm 6.595$ (Mg7) и $111.125\% \pm 1.355$ (Mg13)

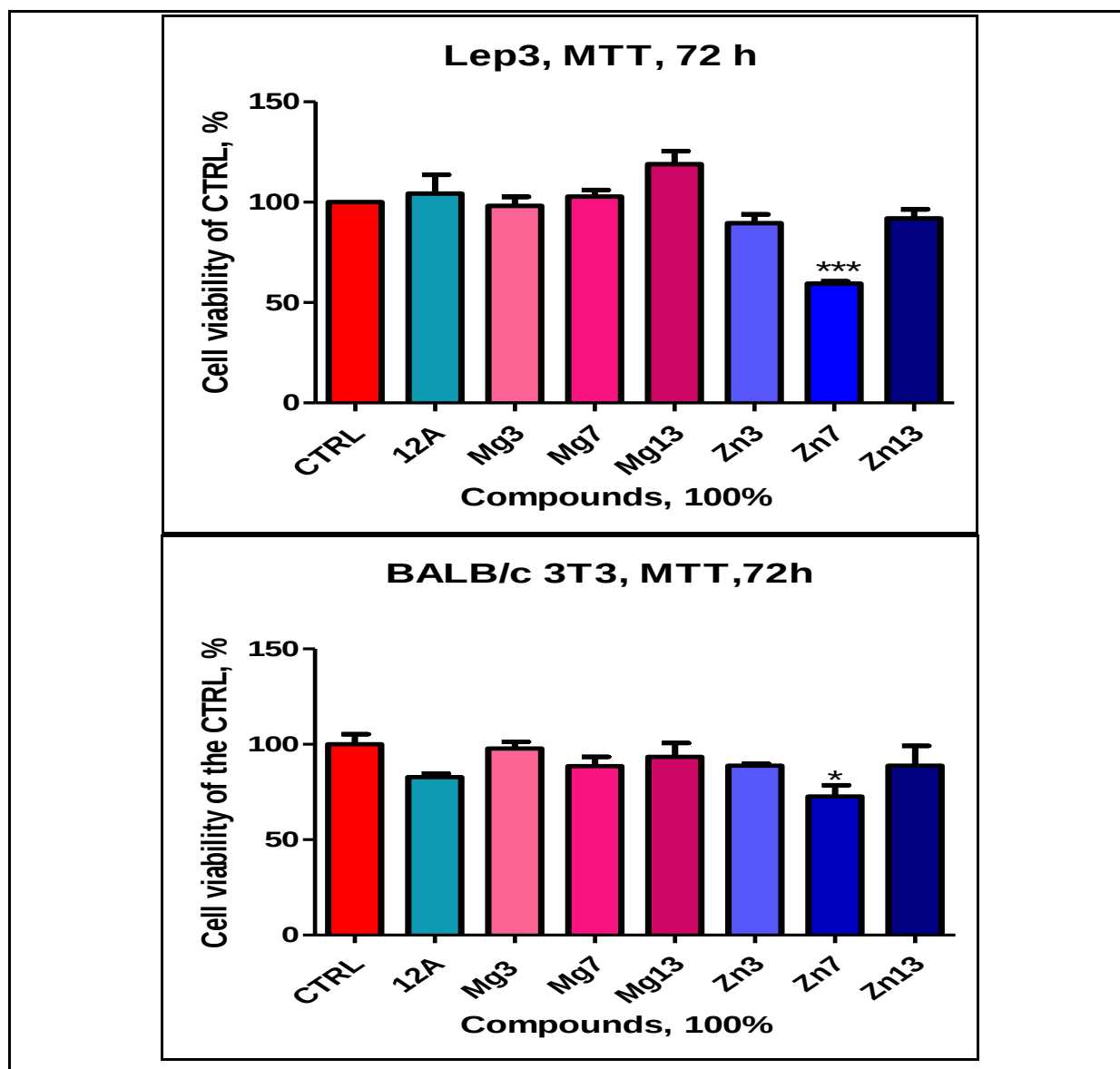
при начална гъстота на клетките 2×10^6 клетки / плака. Подобри резултати бяха получени и при модифицираните с Zn(II) материали (Фиг.9).

Сходни резултати за преживяемостта и пролиферативната активност на третираните клетки бяха получени при различните варианти на проведените от нас експерименти и с трите цитотоксични теста – МТТ тест (МТТ), метод за включване на неутрално червено (NR) и багрено с кристал виолет (CV) (Фиг. 7-8)

При провеждането на изследвания върху човешките ембрионални (Lep3) и мишите ембрионални (BALB/c 3T3) фибробластоидни клетки бяха получени сходни резултати (Фиг. 10). Висока преживяемост на клетките се наблюдаваше и при фибробласти от бял дроб на човек (клетъчна линия MRC-5 данните са показани в дисертациония труд) за Mg- КФМ-цименти.



Фиг. 9. Влияние на КФМ от Група 1 - модифицирани с Zn(II) или Mg(II) прахови образци, върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки от линия Lep3. Клетките са засети с гъстота 2.5×10^5 , 5×10^5 и 1×10^6 клетки / 96 ямкова плаза и са култивирани в продължение на 72 часа в 100%, 75%, 50% и 25% модифицирана среда, получена след предварително инкубиране на съответния материал за 4 часа. Клетъчната преживяемост е отчетена с помощта на МТТ тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. *P<0.05).



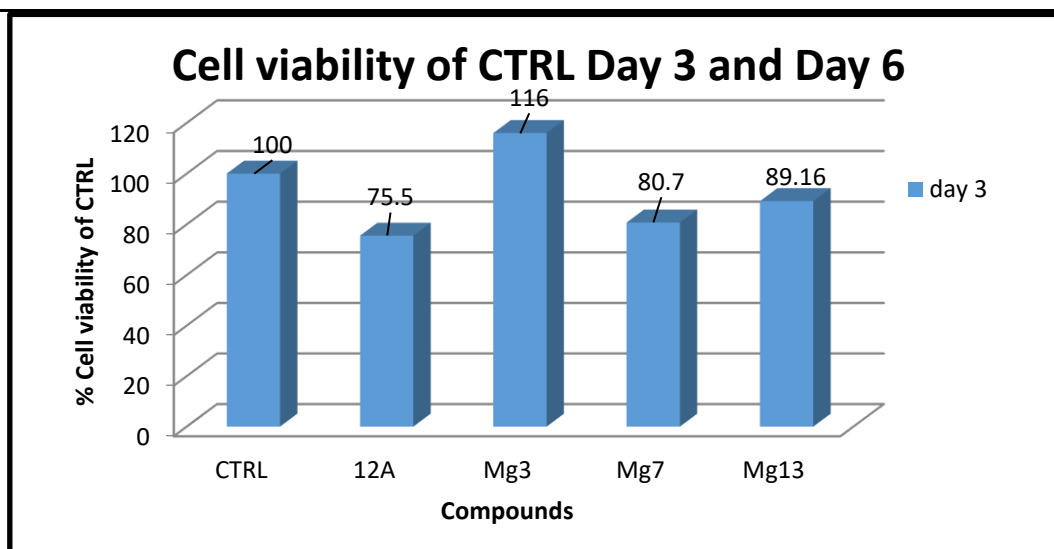
Фиг. 10 Влияние на КФМ от Група 1 - модифицирани с Zn(II) или Mg(II) прахови образци, върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки от линии Lep3 и BALB/c 3T3. Клетките са засети с гъстота 1×10^6 клетки / 96 ямкова плака и са култивирани в продължение на 72 часа в 100% модифицирана среда, получена след предварително инкубиране на съответния материал в нея за 4 часа. Клетъчната преживяемост е отчетена с помощта на MTT тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от теста на Dunnet, с GraphPad Prism v.5.0>(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$); CTRL = Контрола.

V.2. Първични култури от костен мозък на мишка и плъх

Костномозъчните клетки (КМК) са изолирани от бедрени кости на 1-3 месечни мишки от линия ICR и 3-4 месечни плъхове от линия Wistar по стандартна процедура (Виж т. Работа с клетъчни култури, Раздел Материали и Методи; Фиг. 5). По-нататък костномозъчни клетки бяха култивирани в продължение на 72 и 144 часа в среда, предварително инкубирана със съответния КФМ в продължение на 4 часа. Преживяемостта и пролиферативната активност на клетките бяха отчетени чрез метода за оцветяване с трипаново синьо (с помощта на клетъчен брояч на фирма Invitrogen), а в някои случаи за сравнителен анализ беше проведен и МТТ тест. За осъществяването на МТТ теста клетките бяха посявани в 96-ямкови плоскодонни плаки, върху чиято повърхност предварително беше нанесен слой от поли-L-лизин. Получените резултати (Фиг. 11-12, Табл. 6) показаха, че:

- Мишите костномозъчните клетки са сравнително по-силно чувствителни към цитотоксичното действие на изпитваните КФМ в сравнение с ембрионалните миши фибробласти от линия BALB/c 3T3.
- В повечето случаи пролиферативната активност и/или преживяемостта на клетките намалява с увеличаване на времето на третиране (Фиг. 11 и 12). Така например, преживяемостта на мишите костномозъчни клетки, култивирани в КФМ среда, модифицирана с 12A, Mg3, Mg7 и Mg13 е по-ниска на 6^{ия} ден в сравнение с 3^{ия} ден. При КМК култивирани в Mg13 КФМ среда преживяемостта остава висока – 116% на 6^{ия} ден и 99.77% на 6^{ия}. При плъшите КМК, култивирани в КФМ среда модифицирана с 12A и Mg13, преживяемостта нараства на 6^{ия} ден в сравнение с 3^{ия}. Тук е мястото да отбележим, че мишите КМК са засявани с гъстота $5 \times 10^5 - 6 \times 10^5$ клетки / ямка от 24 ямкова плака, а плъшите – по 1×10^6 клетки / ямка от 24 ямкова плака (Фиг. 11).
- Най-висока клетъчна преживяемост/пролиферативна активност беше отчетена при Mg3 (99.77% на 144 час при мишите костномозъчни клетки) и Mg7 (82.46% на 144 час при плъшите костномозъчни клетки).

При някои от веществата (Mg7, Mg13, 12A) бяха проведени изследвания и чрез МТТ тест. Получените резултати са представени в Табл. 6.



Фиг. 11. Влияние на КФМ от Група 1 - модифицирани с метали прахови образци, върху преживяемостта и пролиферативната активност на миши костномозъчни клетки.

Представените данни са обобщени от проведени 5 независими експеримента, във всеки от които са включени средно по пет лабораторни животни (мишки от линия ICR от двата пола). Костномозъчните клетки (засети с гъстота $5-6 \times 10^5$ клетки на ямка от 24-ямкова плака) са култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 100% КФМ среда (инкубирана в течение на 4 часа в присъствие на съответния КФМ). Броят на живите клетки е установен с клетъчен брояч (Invitrogen[™], Countess[™], Automated Cell Counter) чрез метода за оцветяване с трипаново синьо.

Табл. 6. Влияние на КФМ от Група 1 върху преживяемостта и пролиферативната активност на миши костномозъчни клетки (сравнителни проучвания с МТТ и ТВ)

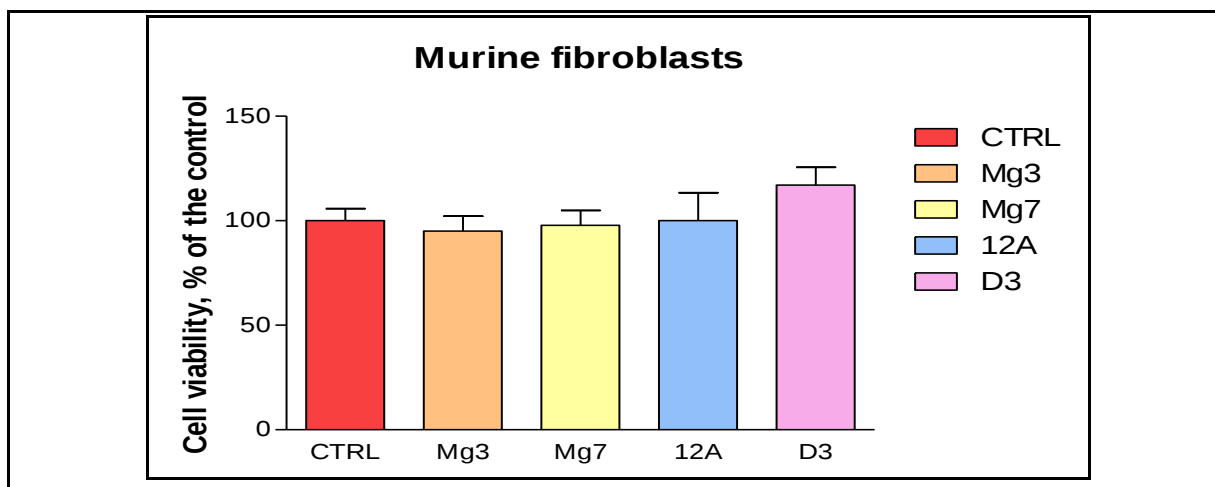
Вещество	Метод	
	МТТ	ТВ
Mg7	63.11 $\pm$ 1,376	80.70
Mg 13	79.37 $\pm$ 0,909	89.16
12A	81.01 $\pm$ 2,439	75.5

Представена е преживяемостта на клетките (в % спрямо контролата), установена чрез МТТ тест (МТТ) и техника за оцветяване на мъртвите клетки с трипаново синьо (ТВ). Двата метода са изпълнени едновременно и при еднакви условия. Използвана е 100% КФМ среда, инкубирана 4 часа в присъствие на КФМ. Времето на въздействие е 72 часа.

В.3. Първични клетъчни култури от костни експланتي на мишка

Получаването на клетъчна култура е представено в Раздел Материали и методи, Табл. 3, фиг.5.

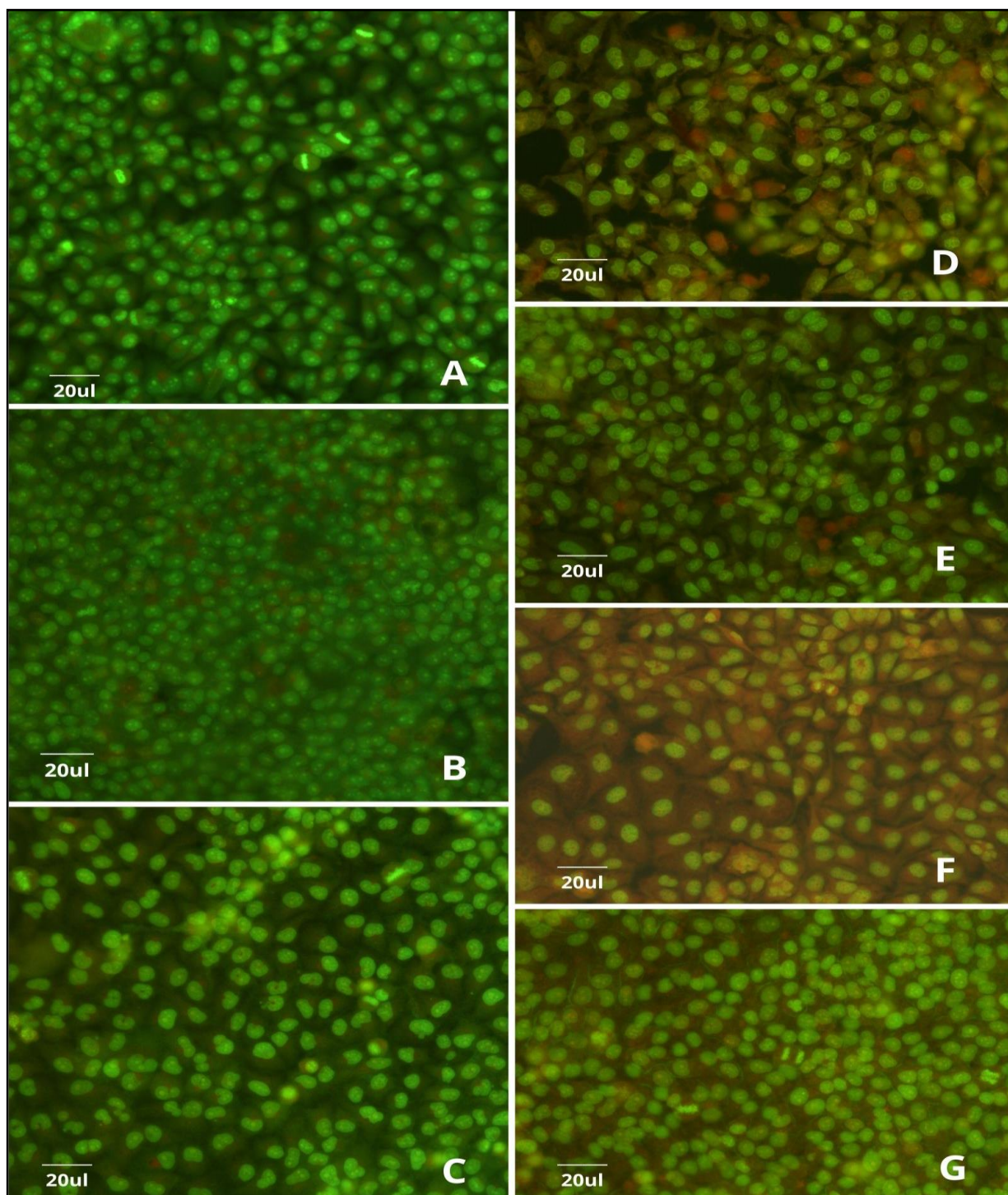
На 8^{ия} пасаж клетките бяха включени в експеримент за определяне на чувствителността им към 100% модифицирана с КФМ среда (Фиг. 12).



Фиг. 12. Влияние на КФМ от Група 1 върху първични култури от костни експлантати от мишка. Клетките са засети с гъстота 1×10^6 клетки / 96 ямкова плака и са култивирани в 100 % модифицирана с КФМ среда (инкубирана 4 часа в присъствие на съответния материал) в продължение на 72 часа. Клетъчната преживяемост е определена чрез МТТ тест. По време на експеримента, клетъчната култура е на 8^{ия} пасаж. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестове на Dunnet и Neuman Kaul, с GraphPad Prism v.5.0. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$); CTRL = Контрола.

V.4. Проучвания върху способността на КФМ от Група 1 да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки

Способността на изпитваните материали от Група 1 да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки беше изследвана чрез комбинирано оцветяване на клетките с акридин оранж и пропидиев йодид. Получените резултати са представени на Фиг. 13. Те показват, че в култивираните в 100% КФМ среда (в която съответният материал предварително е инкубиран в продължение на 4 часа) в продължение на 72 часа клетки не се наблюдават съществени цитопатологични изменения в сравнение с контролата.



Фиг. 13. Клетки от линия Ler3 (човешки ембрионални фибробласти) – контролни и култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 100% КФМ среда, в която съответният материал е инкубиран предварително за 4 часа. Комбинирано оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Изследването е проведено с микроскоп Leica DM 5000B, оборудван с камера Leica DFC 420 C, обектив: x 5, x 10, x 20, x 40, x 100, с имерсия, Софтуер Leica Suite 3.1.0).

А- Контрола; В- КФМ-12А; С - КФМ- Mg3; D- КФМ- Mg7; Е- КФМ-13; F - КФМ- Zn7; G – КФМ- D3

V.5. Изследвания върху генотоксичния ефект на КФМ от Група 1

Проучването беше осъществено чрез провеждане на електрофореза на единични клетки в агарозен гел (Кометно изследване) при неутрално рН, което позволява да бъде установено наличието на двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите. Изследвана беше способността на три КФМ от Група 1 – Mg3, Mg7 и Mg13, да предизвикват увреждания в ДНК молекулите на човешки Lер3 клетки, култивирани в продължение на 72 часа в 100% модифицирана с КФМ среда (инкубирана 4 часа в присъствие на съответния материал). Кометното изследване е известно със своята висока чувствителност, позволяваща да бъдат уловени ранни етапи от увреждането на клетъчната ДНК, респективно на клетката. Именно това е причината, която ни насочи към изпълнението на тази група експерименти. Получените резултати показаха, че модифицираната с Mg3, Mg7 или Mg13 КФМ среда не предизвиква (Mg13) или предизвиква в ограничен процент клетки (7.22% при Mg3) двойноверижни скъсвания в ДНК молекулата. Увреждания в ДНК бяха установени в 22.92% от култивираните в присъствие на модифицирана с Mg13 хранителна среда (Табл. 7).

Табл. 7. Проучване върху способността на модифицирана с Mg3, Mg7 или Mg13 хранителна среда (КФМ среда) да предизвиква двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите на третираните клетки

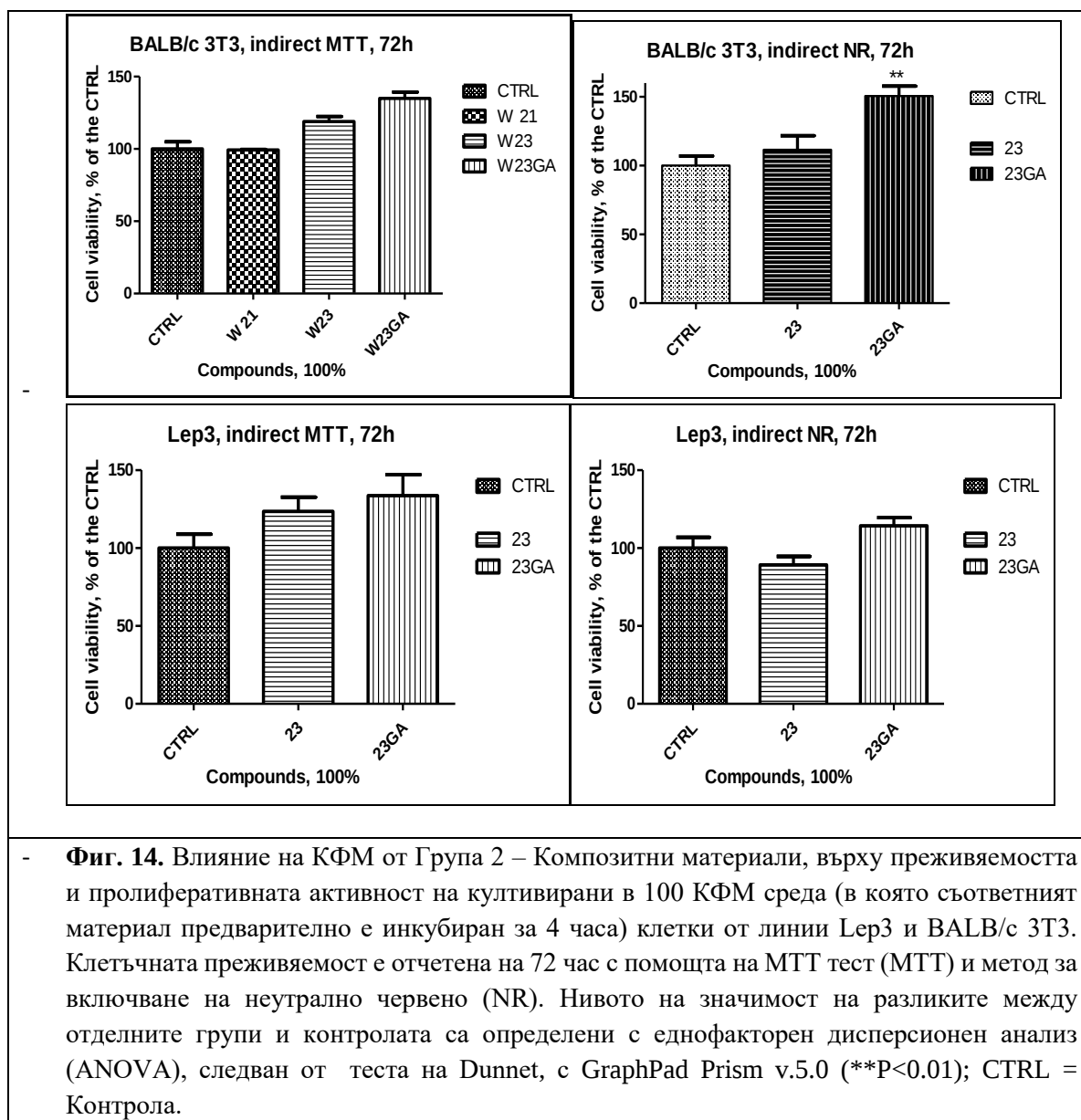
Вещество	Клетки с неувредена ДНК (% спрямо контролата)
Mg3	92.78
Mg7	77.08
Mg13	102.50

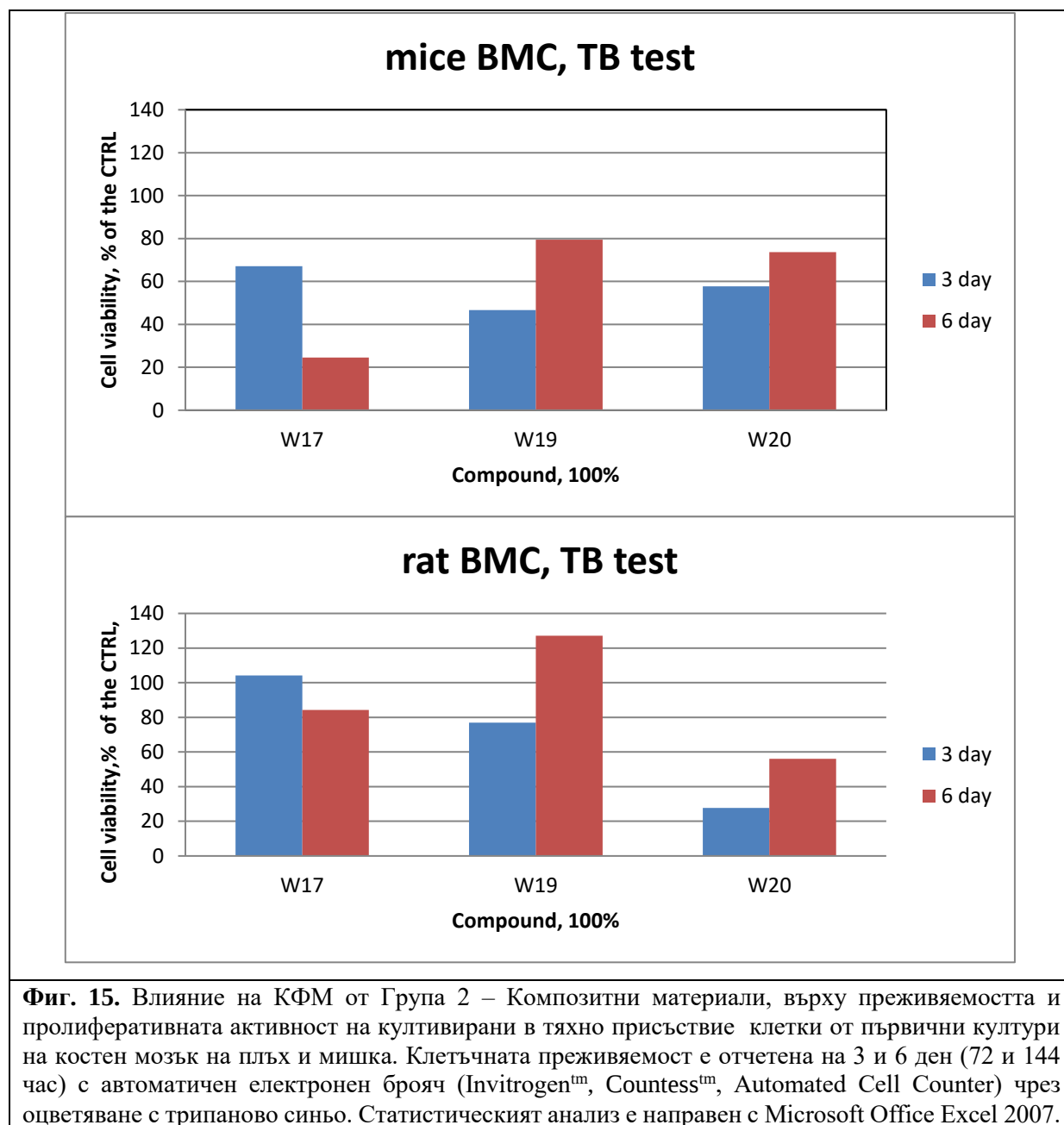
Проучването е проведено чрез електрофореза на единични клетки в агарозен гел (Кометно изследване) при неутрално рН. Клетките от линия Lер3 са култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 100% модифицирана със съответния материал среда (КФМ среда), която е инкубирана 4 часа в присъствие на съответния материал.

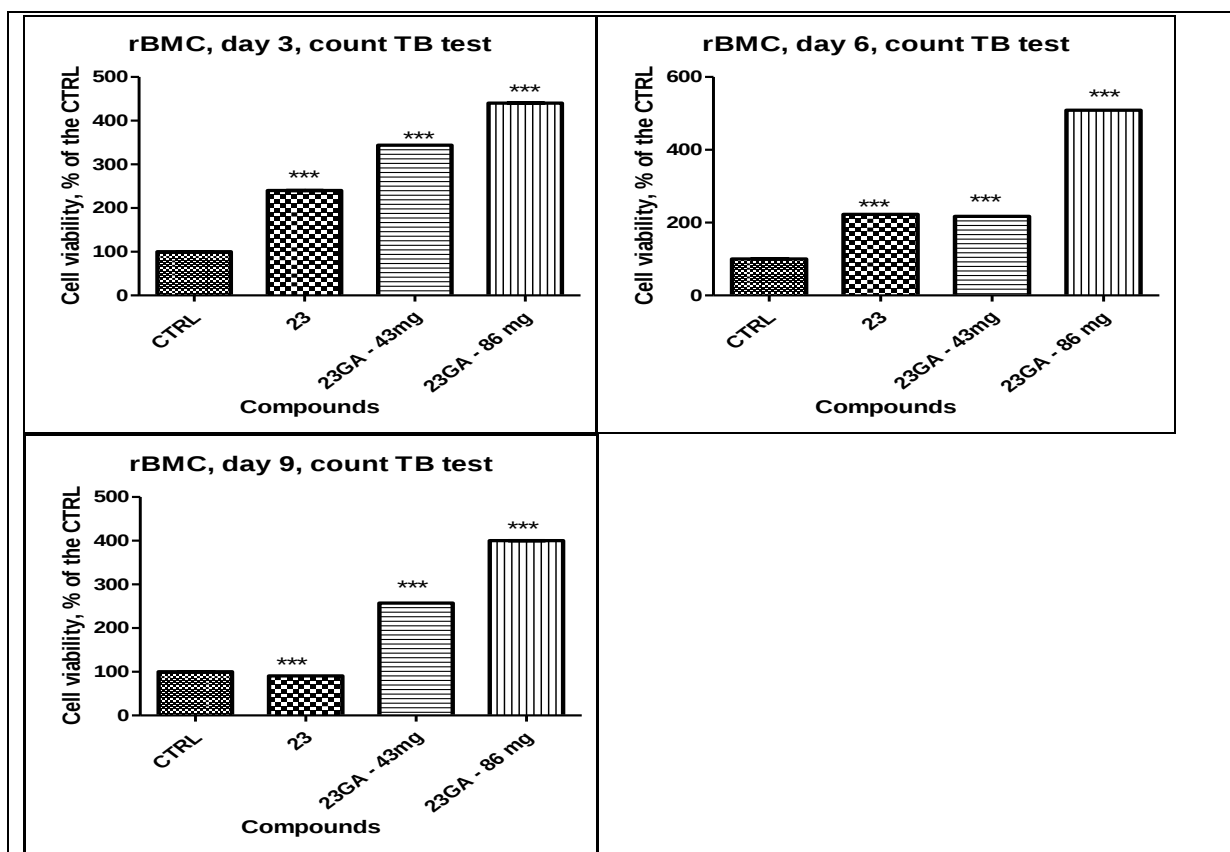
КАЛЦИЕВО-ФОСФАТНИ МАТЕРИАЛИ ОТ ГРУПА 2 – КОМПОЗИТНИ МАТЕРИАЛИ

Изследвано беше влиянието на КФМ от Група 2 – Композитни материали (Виж Табл.1 и Фиг. 4, Раздел „Материали и Методи“), върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки (Lep3) и миши (BALB/c 3T3) ембрионални клетки и първични култури от костномозъчни клетки от мишка и плъх. За целта бяха проведени индиректни експерименти, при които клетките бяха култивирани в 100% КФМ среда (получена чрез предварителна инкубация на съответния материал в хранителна среда най-често за 4 часа) или в присъствие на материала. Получените експериментални данни показаха, че:

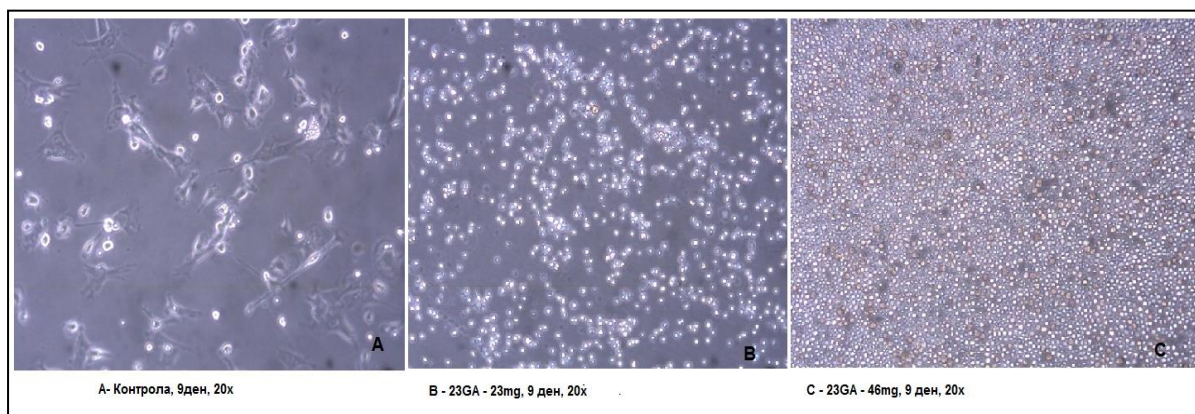
- Преживяемостта на култивирани за 72 часа в 100% КФМ среда човешки (Lep3) и миши (BALB/c 3T3) ембрионални клетки е сравнима или по-висока в сравнение с контролата, като в някои случаи (W23Ga, BALB/c 3T3, NR) разликите са статистически значими ($p < 0.001$). Сходни резултати са получени чрез МТТ тест и метода за включване на неутрално червено (Фиг. 14).
- С удължаване на времето на култивиране в присъствие на фиг.15 от 3 на 6 дена (72 – 144 часа) броят на живите миши и плъши КМК култивирани в присъствие на W19 и W20 се увеличава, а в присъствие на W17 намалява. Най-висока преживяемост и при двата вида клетки е намерена при W19 - % на живите клетки спрямо контролата на 6-ия ден достига 80% при мишите КМК и >120% при плъшите КМК (Фиг. 15).
- Висока е и преживяемостта на плъшите КМК култивирани за 1-9 дена в присъствие на W23 и WGA – броят на живите клетки спрямо контролата надхвърля 200%-300% и дори 400% (Фиг. 16). Усилената пролиферация на плъши КМК беше демонстрирана и при светлинномикроскопски наблюдения на клетъчната култура (Фиг. 17).
- Прави впечатление, че преживяемостта на плъшите КМК, култивирани в присъствие на W23GA нараства с увеличаване на количеството на материала - от 43mg на 86mg (Фиг. 58).







Фиг. 16. Влияние на КФМ от Група 2 – Композитни материали, върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в тяхно присъствие първични култури от плъши костномозъчни клетки. Клетъчната преживяемост е отчетена на 3, 6 и 9 ден с автоматичен електронен брояч (Invitrogen™, Countesstm, Automated Cell Counter) чрез оцветяване с трипаново синьо. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от теста на Dunnet, с GraphPad Prism v.5.0 (***) $P < 0.001$; CTRL = Контрола.



Фиг. 17. Плъши костномозъчни клетки – контрола (А) и култивирани в продължение на 9 дни в присъствие на материала W23GA-23 mg (В) и W23GA-46 mg (С). Светлинно-микроскопски наблюдения с микроскоп Olympus, 20х

БИОСЪВМЕСТИМОСТ И ОСТЕОИНДУКТИВНОСТ НА МАТЕРИАЛИ ОТ ГРУПА 3 – ЦИМЕНТИ (АМОРФНИ КАЛЦИЕВИ ФОСФАТИ)

V.6.1 Биосъвместимост при миши и човешки клетъчни линии

Изпитваните материали от Група 3 – Цименти (Аморфни калциеви фосфати), са представени в Табл. 1 и Фиг 4 на раздел Материали и методи. Преди работа бяха стерилизирани по два метода – облъчване с УВ светлина или автоклавиране в продължение на 15 минути. Те бяха включени в изпълнението на два типа експерименти – индиректни и директни (Фиг. 2, Раздел Материали и методи). За индиректните експерименти е използвана 100% КФМ среда, в която материалите бяха предварително инкубирани за различен период от време. Проучванията бяха осъществени с три групи клетъчни култури: 1) миши Фибробласти и костномозъчни клетки; клетки получени от костен експлант на мишка (по време на експериментите бяха на 10-58 пасаж); 2) човешки туморни и нетуморни постоянни клетъчни линии и 3) мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан на човек – беше направен опит да бъде стимулирана остеогенната диференциация на тези клетки. Получените резултати ще бъдат представени последователно. За директните експерименти материалите бяха изработени под формата на таблетки и поставяни на дъното на ямки от 48 ямкова плака, а клетките бяха култивирани директно върху тях. На Фиг.26 са представени таблетки от АСР-ТА след приключване на директен експеримент с МТТ тест.

Миши ембрионални фибробласти клетки и костномозъчни клетки

Работата ни с този тип костни заместители започна с изследване на влиянието на АСР-ТА и АСР-ТА-Mg върху преживяемостта и пролиферативната активност на миши ембрионални Фибробласти клетки от линия BALB/c 3T3. При подготовката на модифицираната в присъствие на материалите среда (КФМ среда), необходима за индиректните експерименти, е следвано съотношението 50 mg материал в 2 ml хранителна среда. Времето за инкубация на материала в присъствие на материала беше различно – в случая 4 (КФМ среда – 4 часа), 24 (КФМ среда – 24 часа), 72 (КФМ среда – 72 часа) и 144 часа (КФМ среда – 144 часа).

На Фиг. 18 са представени данни за преживяемостта / пролиферативната активност на мишите ембрионални фибробласти от линия BALB/c 3T3, култивирани 72 часа в КФМ

среда, инкубирана предварително в присъствие на съответния материал за 4, 24, 72 и 144 часа.

Получените от нас резултат разкриват, че:

- Преживяемостта / Пролиферативната активност на клетките, култивирани в КФМ среда, инкубирана в присъствие на АСР-ТА и АСР-ТА-Mg е доста сходна (Фиг. 18).
- С удължаване на времето на инкубация на материалите в хранителната среда броят на живите клетки в сравнение с контролата се увеличава (Фиг. 18-19). Възможно е това да се дължи на отделяне от материалите на вещество/а, което/които стимулират растежа на клетките. Тази зависимост беше наблюдавана както при мишите ембрионални фибробласти (BALB/c 3T3), така и при културите от костен експлант от мишка и мишите костномозъчни клетки (Фиг. 18-19).
- Проведените директни експерименти (при които материалът е поставен на дъното на ямките от 48-ямкова плака и клетките са култивирани директно върху него) показват, че с удължаване на времето на култивиране броят на живите клетки в сравнение с Контролата се увеличава, като нарастването е статистически достоверно (Фиг. 19).
- Увеличаването на количеството на материала (от 0.3 mg на 0.7 mg; от 0.8 mg на 2000 mg) на дъното на ямката също води до повишаване на клетъчната преживяемост / пролиферативна активност при осъществяването на директните експерименти с АСР-ТА и АСР-ТА-Mg (Фиг. 20).
- Сравнителният анализ на данните показва, че при директните експерименти процентът на живите клетки нараства с увеличаване на времето на култивиране (Фиг. 18-19-20), а при индиректните – с удължаване на периода на инкубиране на материала в хранителната среда. Такова повишаване на преживяемостта се наблюдава най-отчетливо, когато клетките са култивирани в КФМ-среда, предварително инкубирана за 3 и 6 дена в присъствието на материала (АСР-ТА и АСР-ТА-Mg) (Фиг. 18-19). При удължаване на времето на инкубация (8 и 10 дена) процентът на живите клетки намалява, но не пада под стойностите за КФМ среда – 3 дена (Фиг. 18). Най-висока е преживяемостта на клетките, култивирани в КФМ среда, инкубирана за 4 и 24 часа в присъствие на АСР-ТА, АСР-ТА-Mg. Сходни високи стойности са регистрирани при АСР-ТА-Mg, култивиран в КФМ среда, култивирана в присъствието му за 1 и 6 дена (Фиг.19.).

- При АСР-ТА-На преживяемостта на клетките (миши костномозъчни клетки) намалява с удължаване на времето, за което хранителната среда е била инкубирана в негово присъствие (Фиг. 21). Докато преживяемостта / пролиферативната активност на клетките, култивирани в КФМ-АСР-ТА среда и КФМ-АСР-ТА-Mg надвишава тази в контролата, то КФМ-АСР-ТА-На определено проявява цитотоксичен ефект (Фиг. 22-23). Това беше причината АСР-ТА-На да бъде изключен от по-нататъшни експерименти.

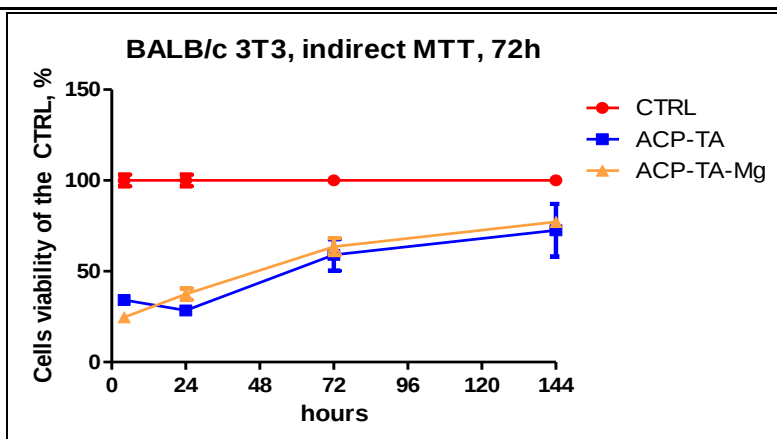
Човешки нетуморни и туморни клетъчни линии

А. Човешки нетуморни клетки от линии Lер-3 и ВJ

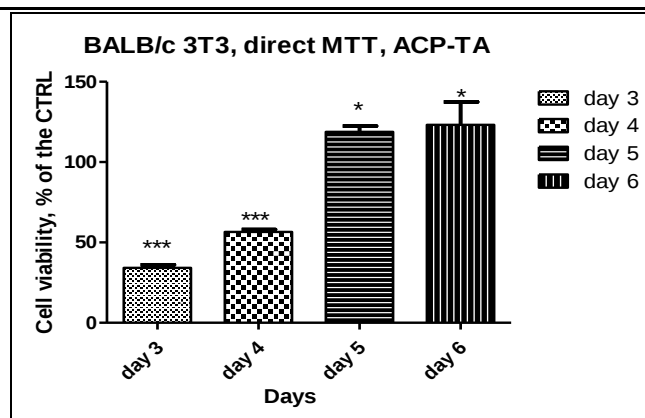
Висока цитосъвместимост на изпитваните материали – АСР-ТА, АСР-ТА-Mg, АСР-СА-5%, АСР-СА-18 и ТТСР, е установена и при проведени директни и индиректни експерименти с клетки от линия Lер-3.

Сравнително по-ниска е преживяемостта на клетките от линия ВJ, култивирани директно върху изпитваните материали АСР-ТА, АСР-ТА-Mg, АСР-СА, и особено върху АСР-LA (Фиг. 21-23).

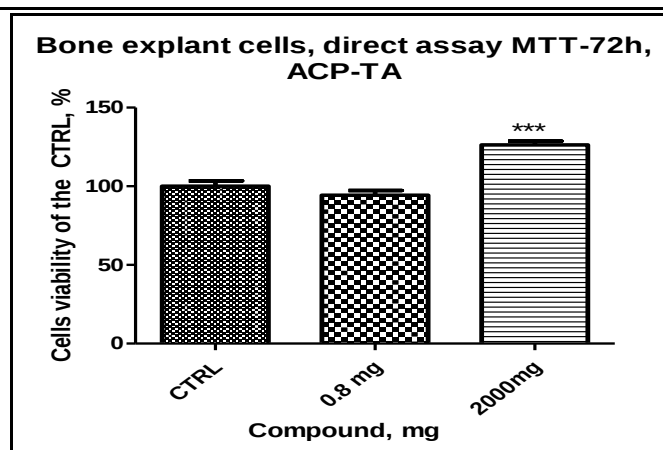
Сходни резултати са получени при индиректните и директните експерименти с миши и човешки клетки (Фиг. 21-23) и използване на различни методи – МТТ и тест за включване на неутрално червено, МТТ и техника за оцветяване с трипаново синьо (Фиг. 19)



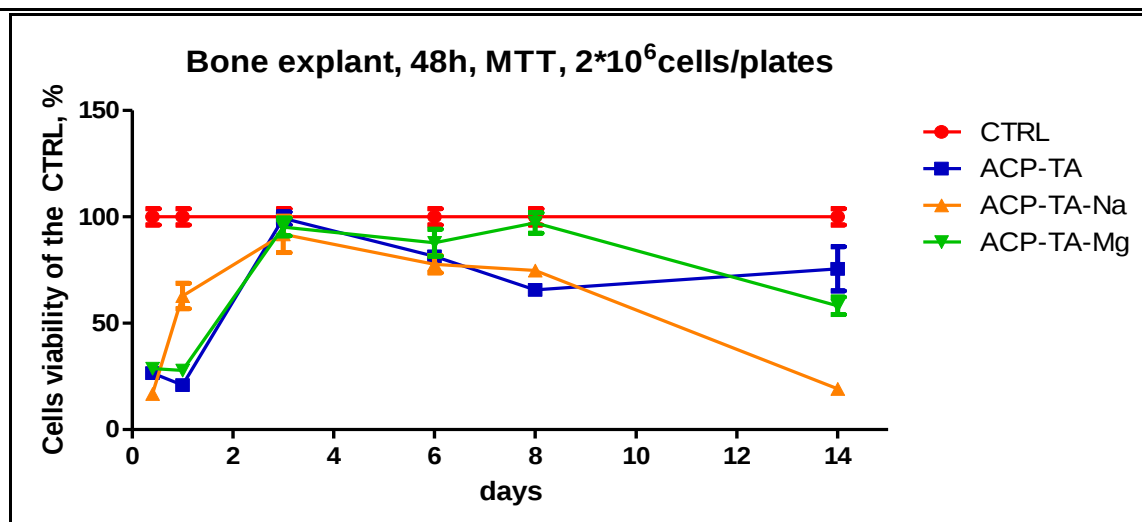
Фиг. 18. Сходен цитотоксичен профил на два цимента на основата на аморфни калциеви фосфати - АСР-ТА и АСР-ТА-Мг. Миши ембрионални фибробласти от линия BALB/c 3T3 са култивирани за 72 часа в КФМ среда, предварително инкубирана за 4, 24, 72 и 144 часа в присъствие на съответните материали (Индиректен експеримент). Клетъчната преживяемост / пролиферативна активност е определена с МТТ тест.



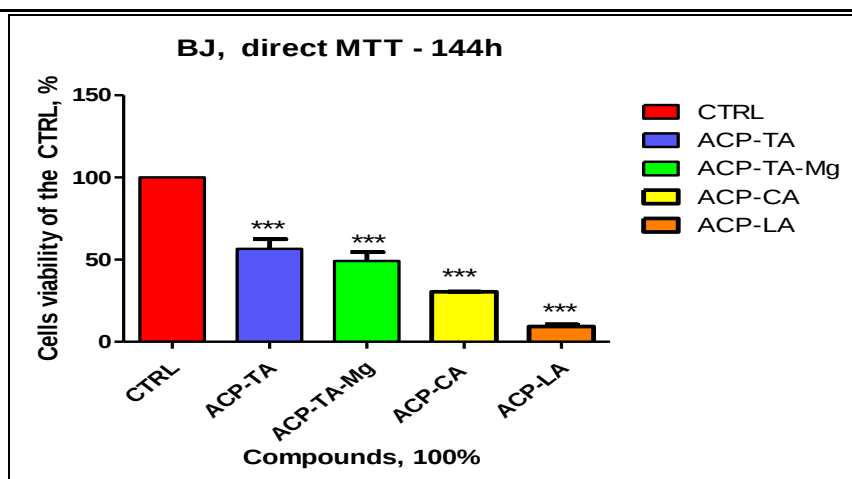
Фиг. 19. Сравнение на влиянието на АСР цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в тяхно присъствие клетки от линия BALB/c 3T3. Проучванията са проведени чрез директен и индиректен експеримент с помощта на МТТ тест. При осъществяване на индиректните експерименти клетките са култивирани в 100% КФМ среда предварително инкубирана в присъствието на съответния материал за 3, 4, 5 и 6 дена. Клетъчната преживяемост / пролиферативна активност е определена на 72 час (при индиректните експерименти – А) и 72 и 144 час (при директните експерименти – В). Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (* P<0.05; ***P<0.001).



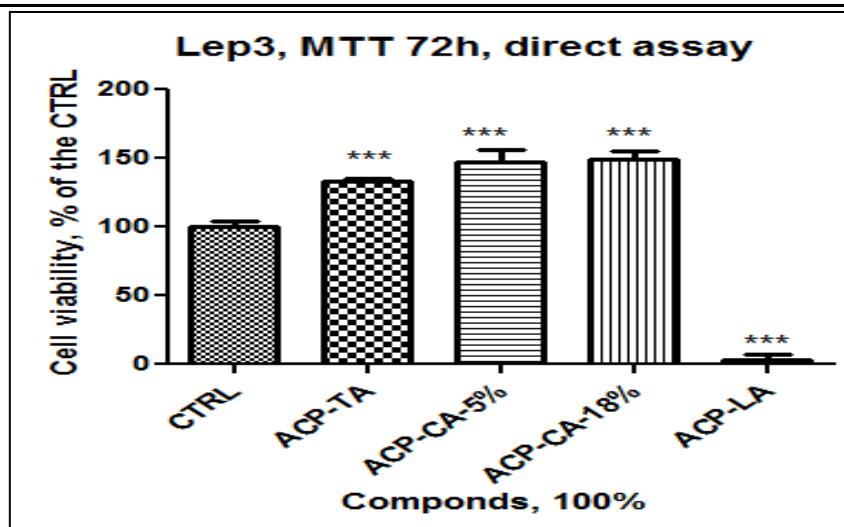
Фиг. 20. Влияние на АСР – ТА върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от първична култура от експлант от бедрена кост на мишка (клетките са на 23 пасаж). Проведен е директен експеримент, при който клетките са култивирани за 72 часа върху материала („Таблетките“ на дъното на ямките от 48-ямковата плака са с маса 0.8 mg и 2000 mg). Проучването е проведено чрез МТТ тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (***) $P < 0.001$.



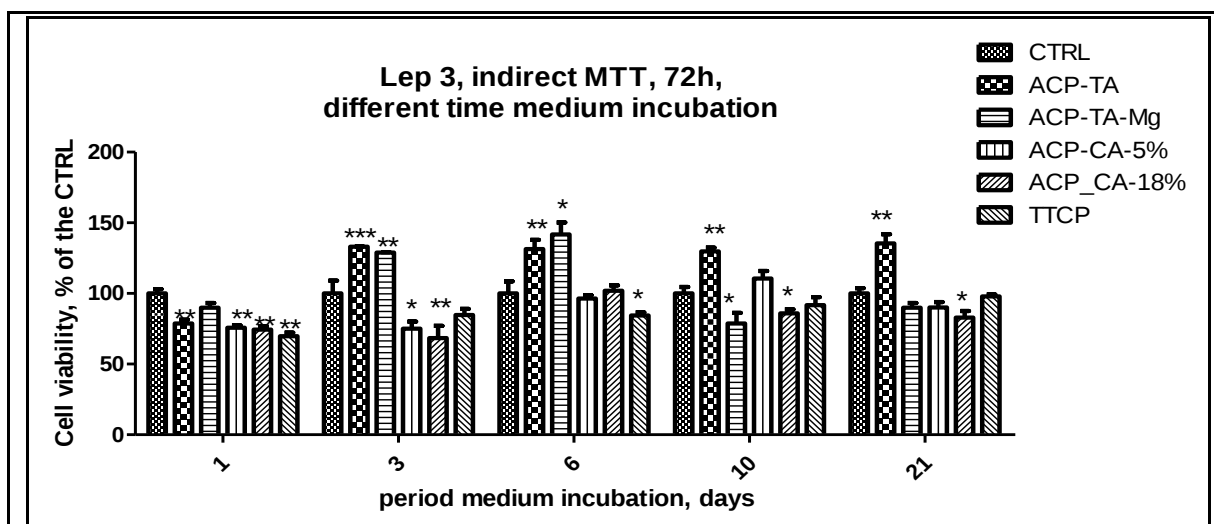
Фиг. 21. Влиянието на АСР - цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от първична култура от експлант от бедрена кост на мишка (клетките са на 22 пасаж). Проведен е индиректен експеримент, при който клетките са култивирани за 48 часа в 100% КФМ среда, предварително инкубирана в присъствие на съответния материал в продължение на 4 часа, 1, 3, 6, 8 и 14 дена. Проучването е проведено чрез МТТ тест



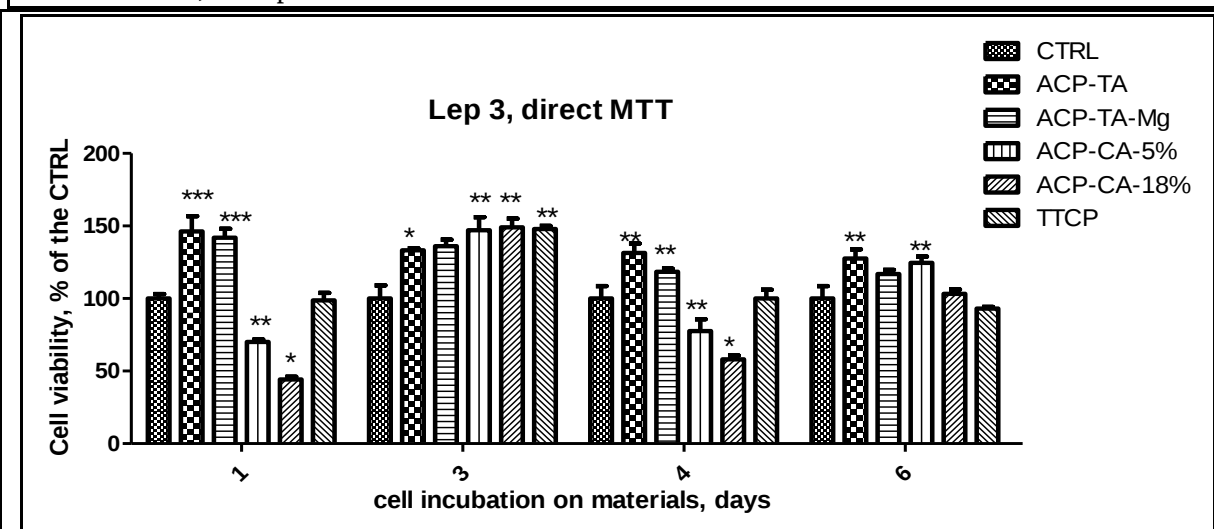
Фиг. 22. Влияние на АСР цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от линия BJ. Проведен е директен експеримент, при който клетките са култивирани за 144 часа върху материалите (поставени под формата на „таблетки“ на дъното на ямките на 48-ямкова плака). Проучването е проведено чрез MTT тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (***P<0.001).



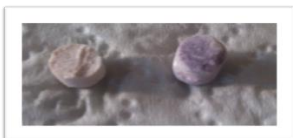
Фиг. 23. Влияние на АСР цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от линия Lep 3. Проведен е директен експеримент, при който клетките са култивирани за 72 часа върху материалите (поставени под формата на „таблетки“ на дъното на ямките на 48-ямкова плака). Проучването е проведено чрез MTT тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (***P<0.001).



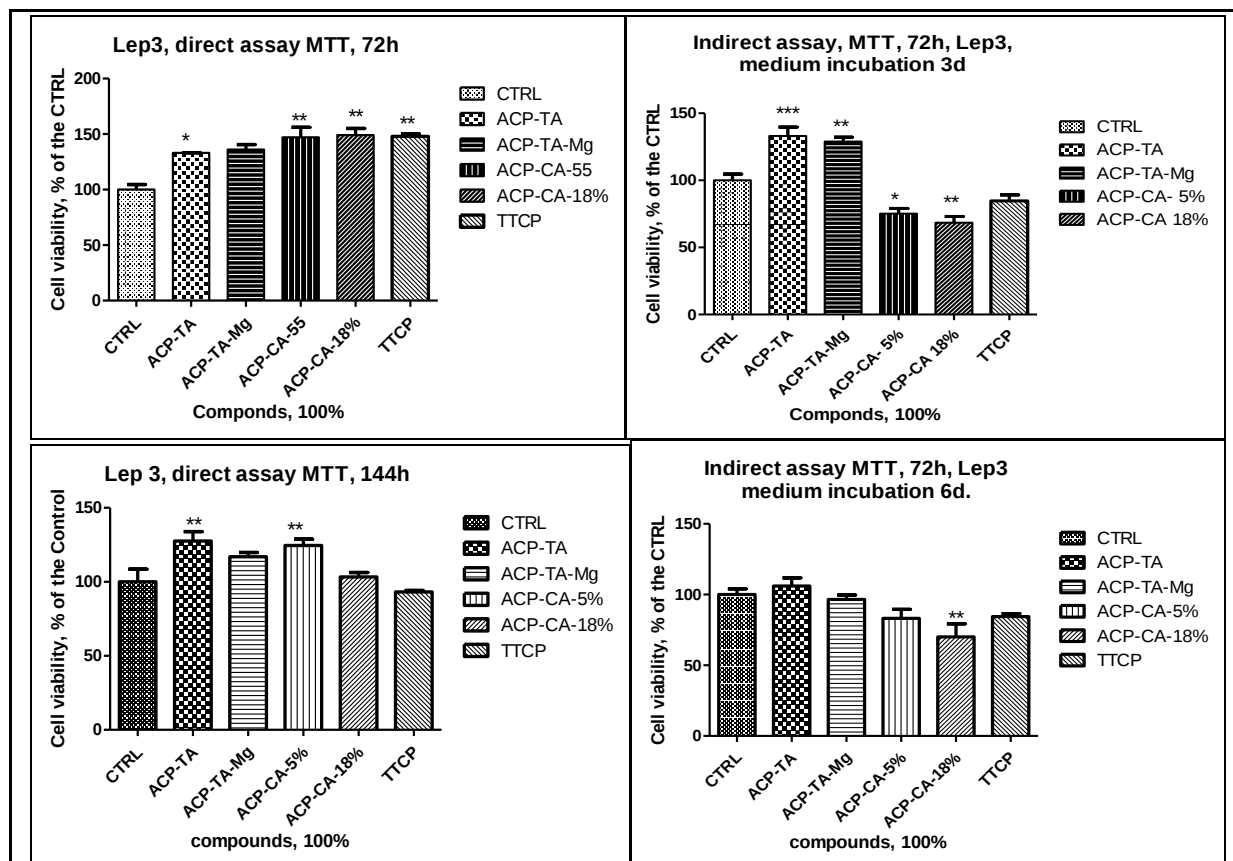
Фиг. 24. Влияние на АСР цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки ембрионални Фибробласти клетки (Lep-3). Проведен е индиректен експеримент, при който клетките са култивирани за 72 часа в 100% КФМ среда, предварително инкубирана в присъствие на материала в продължение на 4 часа, 1, 3, 6, 10 и 21 дена. Проучването е проведено чрез МТТ тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0



Фиг. 25. Влияние на АСР цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки ембрионални фибробластoidни клетки (Lep-3). Проведен е директен експеримент, при който клетките са култивирани за 72 часа върху материалите (поставени под формата на „таблетки“ на дъното на ямките на 48-ямкова плака). Проучването е проведено чрез МТТ тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0.



Фиг. 26. Таблетки от АСР-ТА след приключване на директен експеримент с МТТ тест. Клетки от линия Lep3, вдясно е материалът, върху който клетките са прилепнали и са пролиферирали (лилавият цвят се дължи на превръщането на МТТ от митохондриалната сукцинат дехидрогеназа във формазан), вляво е материалът контрола.



Фиг. 27. Сравнение на влиянието на АСР цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в тяхно присъствие клетки от линия Lep-3. Проучванията са проведени чрез директни (A,C) и индиректни (B, D) експерименти с помощта на МТТ тест. При осъществяване на индиректните експерименти клетките са култивирани в 100% КФМ среда предварително инкубирана в присъствието на съответния материал за 3 и 6 дена. Клетъчната преживяемост / пролиферативна активност е определена на 72 час (3^{ти} ден) и 144 час (6^{ти} ден). Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (* P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

Б. Човешки остеосаркомни клетки от линия SAOS-2

Проведена беше група експерименти с човешки остеосаркомни клетки от линия SAOS-2, с чието осъществяване си поставихме следните задачи:

- Получаване на информация за влиянието на изпитваните материали върху преживяемостта / пролиферативната активност на клетки с остеогенен произход (макар в случая те да са злокачествено трансформирани);
- Да оптимизираме и въведем в лабораторната ни практика методи за оценяване на потенциалното цитотоксично действие на материали за костни заместители (MTS тест), както и на физиологичната им активност (метод за определяне на количество на алкална фосфатаза), на възможността да бъдат подходяща среда (3D среда), върху която клетките да прилепват и в която да навлизат и да пролиферират (сканираща електронна микроскопия);
- Да определим редица параметри, което да подпомогне следващите ни стъпки, а именно – изолиране и работа с МСК и опити за насочване на диференциацията им към остеобласти и остеоцити.

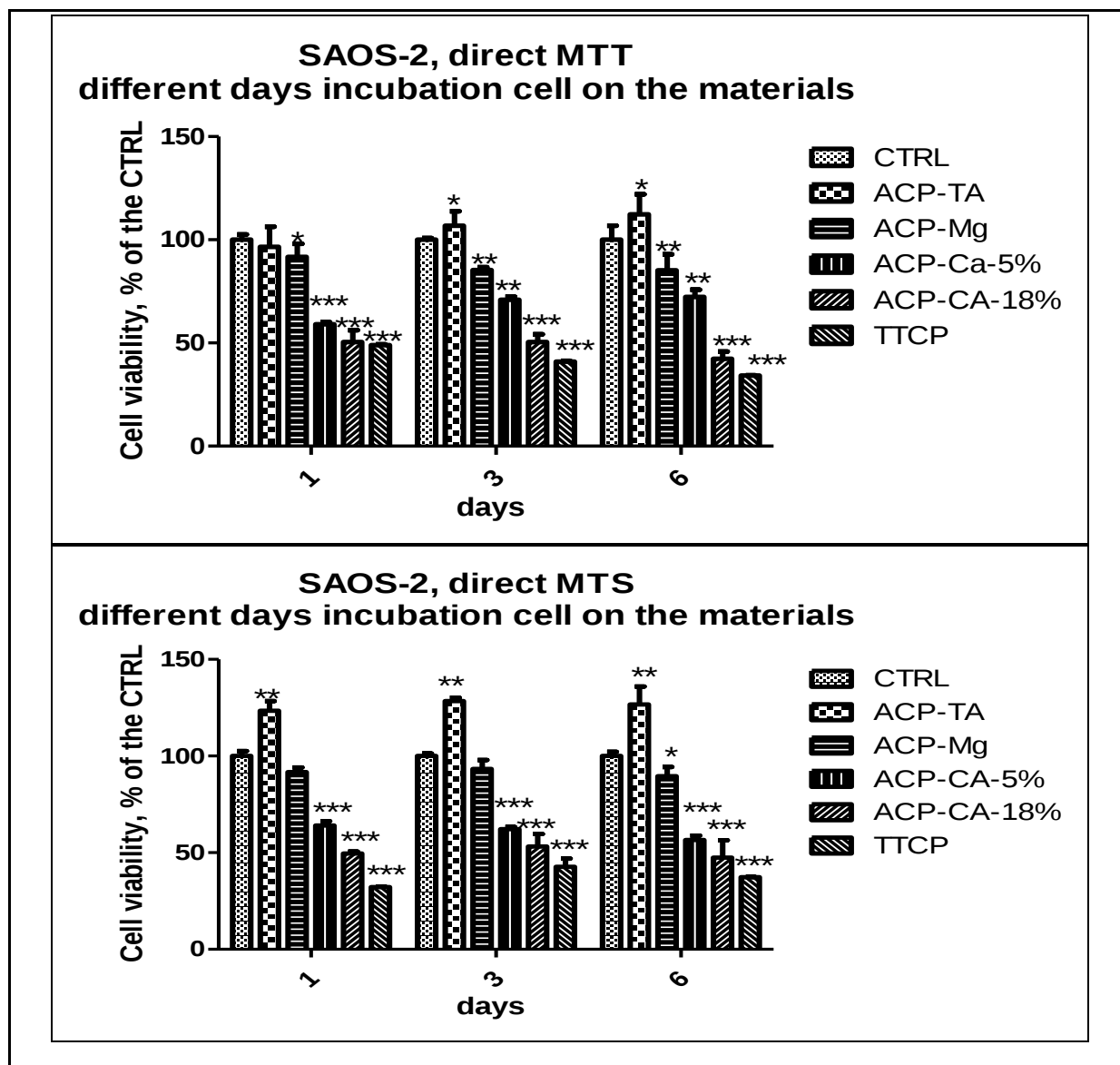
Получените резултати потвърдиха добрата цитосъвместимост на изследваните материали за костни заместители, особено АСР-ТА и АСР-ТА-Mg (Фиг. 28 и 29). Напълно очаквано, сходни резултати бяха получени чрез МТТ тест и MTS тест.

При оцветяване с хематоксилин и еозин и двойно флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид не се откриват цитоморфологични изменения в клетките от тази линия, култивирани в продължение на 3 и 6 дена в присъствие на КФМ среда, предварително инкубирана в продължение на 3 и 6 дена в присъствие на АСР-ТА и АСР-ТА-Mg (Фиг. 107-109). От друга страна, в култивираните при същите условия клетки – нетретирани (Контроли) и култивирани в описаните по-горе КФМ среди клетки се наблюдава активна пролиферация, обхващаща >80% (при култивиране в продължение на 3 дена) и >50% (при култивиране в продължение на 6 дена) от клетките (Фиг. 105 и 106).

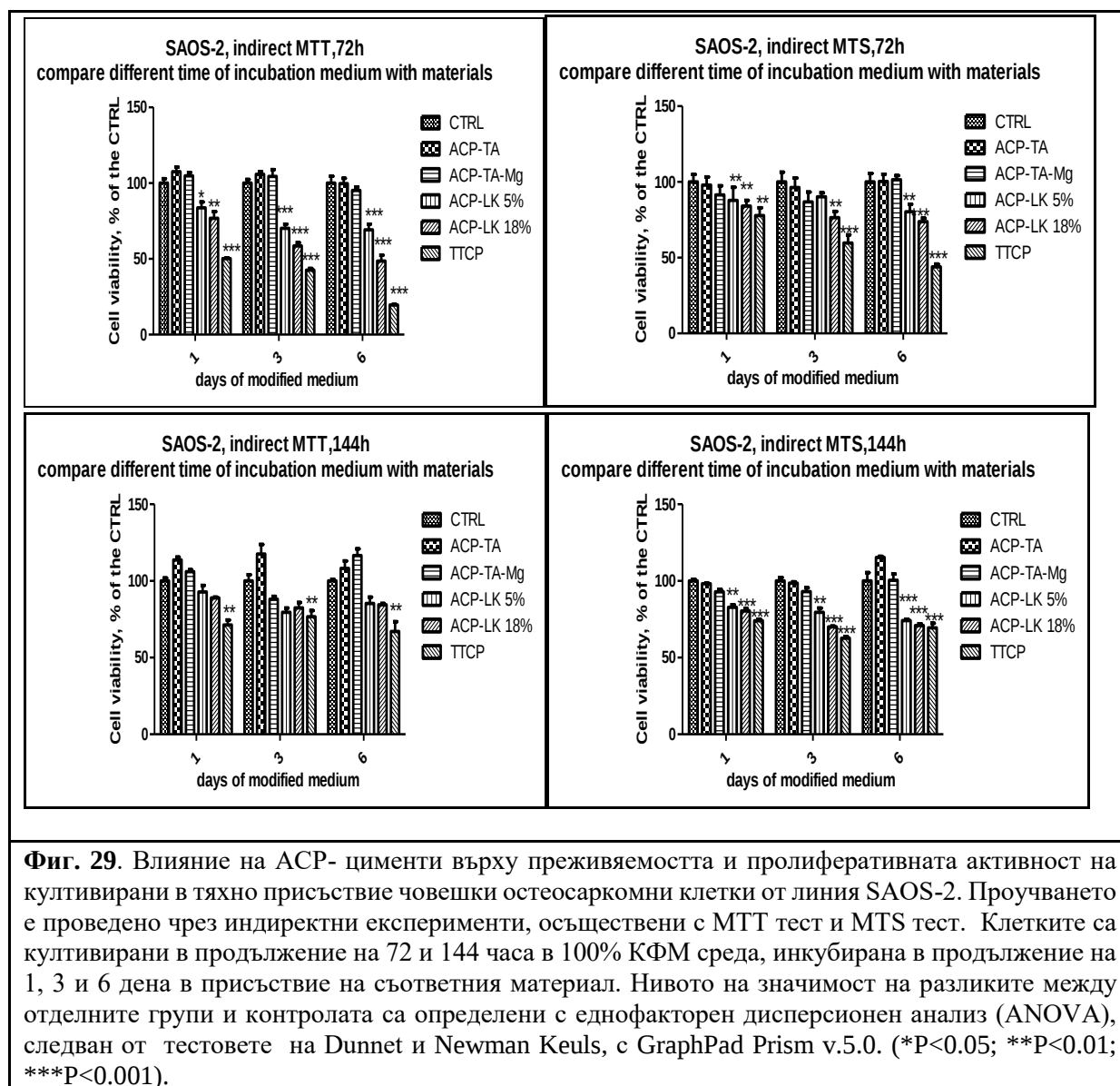
Оптимизирани бяха условията за определяне на количеството на ензима алкална фосфатаза, включително беше установена най-подходящата концентрация на клетките (1×10^5 клетки в сравнение с 5×10^4 и 2×10^5) при провеждане на това изследване. По-голямо количество алкална фосфатаза беше доказано в културалната течност на човешки остеосаркомни клетки култивирани в продължение на 6 дена в:

- КФМ среда, в която АСР-ТА и АСР-ТА-Mg са предварително инкубирани за 3 и 6 дена (Фиг. 28-29). В единия от случаите количеството на ензима при клетките, култивирани в КФМ, предварително инкубирана в продължение на 3 дни с изпитваните материали е по-ниска, но сравнима с контролата, докато в останалите се увеличава (Фиг.28-29).

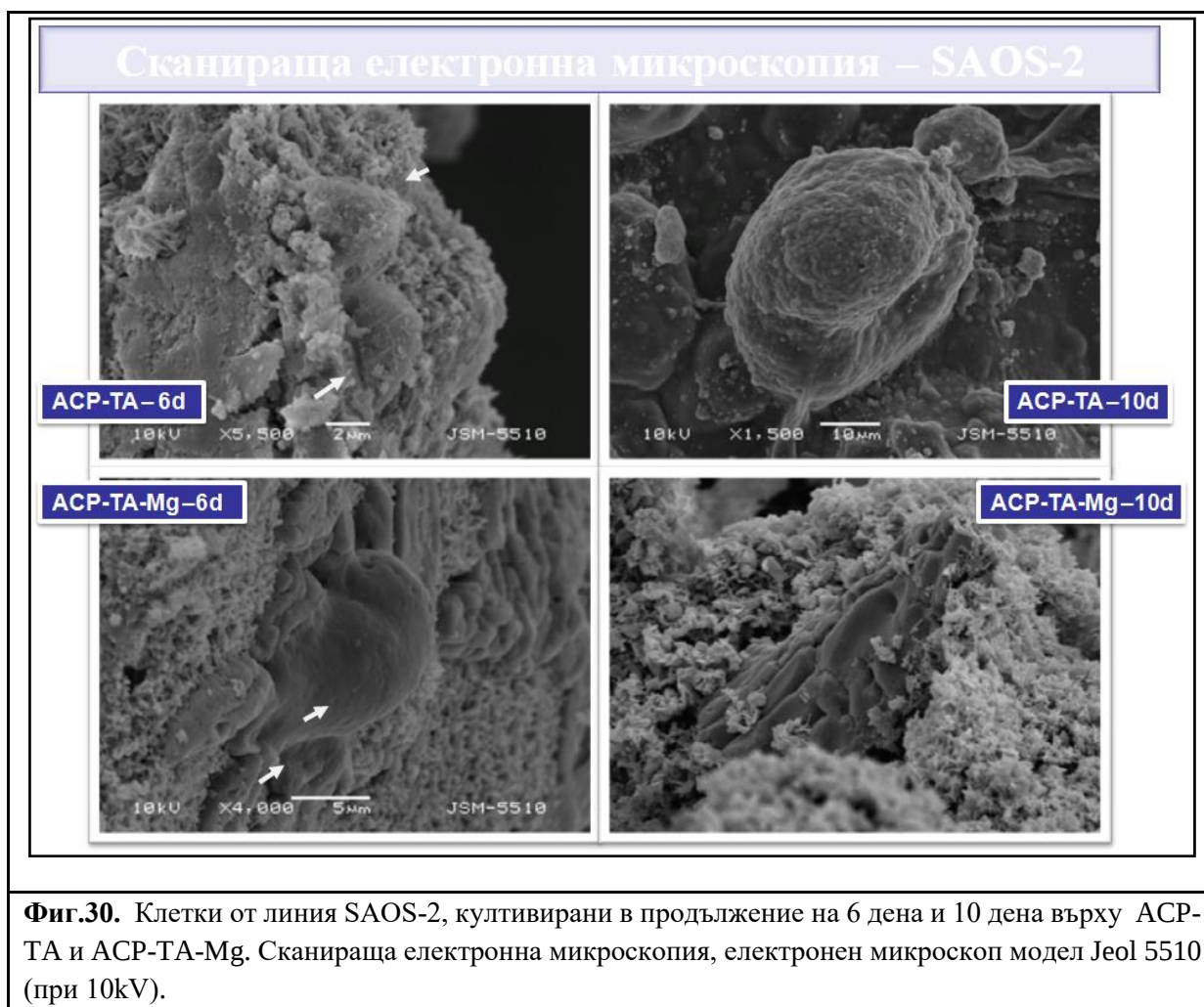
С помощта на СЕМ анализ (Фиг. 30) беше визуализирана способността на клетките от линии BALB/c 3T3, Lер-3 и SAOS-2 да прилепват и да пролиферират върху повърхността на изпитваните материали от Група 3 (ACP-TA, ACP-TA-Mg, ACP-CA-5%, TTCP), включително и във вътрешността им (клетките от линия SAOS-2)



Фиг. 28. Влияние на АСР- цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в тяхно присъствие човешки остеосаркомни клетки от линия SAOS-2. Проучването е проведено чрез директни експерименти, осъществени с МТТ тест и МТS тест след култивиране на клетките върху материалите в продължение на 1, 3 и 6 дена. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).



Фиг. 29. Влияние на АСР- цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в тяхно присъствие човешки остеосаркомни клетки от линия SAOS-2. Проучването е проведено чрез индиректни експерименти, осъществени с МТТ тест и МТS тест. Клетките са култивирани в продължение на 72 и 144 часа в 100% КФМ среда, инкубирана в продължение на 1, 3 и 6 дена в присъствие на съответния материал. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).



Фиг.30. Клетки от линия SAOS-2, култивирани в продължение на 6 дена и 10 дена върху ACP-TA и ACP-TA-Mg. Сканираща електронна микроскопия, електронен микроскоп модел Jeol 5510 (при 10kV).

Човешки мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан

Проведените в предишните раздели проучвания и най-вече резултатите за обещаващата цитосъвместимост на изпитваните материали от Група 3 – особено ACP-TA, ACP-TA-Mg, TTCP, както и възможността те да бъдат синтезирани в удобна за провеждане на биологични експерименти форма (директни и индиректни експерименти) и да позволяват стерилизация с достъпни средства и методи, ни насърчи да изследваме способността на някои от тях да стимулират остеогенната диференциация на човешки мезенхимни клетки, с други думи, да служат като 3D матрица за костно тъканно моделиране (костно тъканно инженерство).

За постигането на тази цел беше необходимо:

1. Да изолираме, идентифицираме и култивираме човешки мезенхимни стволови клетки, както и да определим цитосъвместимостта на изследваните материали за костни заместители;
2. Да изберем материал, с който да проведем изследванията.

Получени бяха МСК от адипозна тъкан (тъкан и аспират от тъкан) – процедурата е подробно описана в Табл. 1 и Фиг. 1 на Раздел „Материали и Методи“ и е успешно въведена в рутинната ни лабораторна практика.

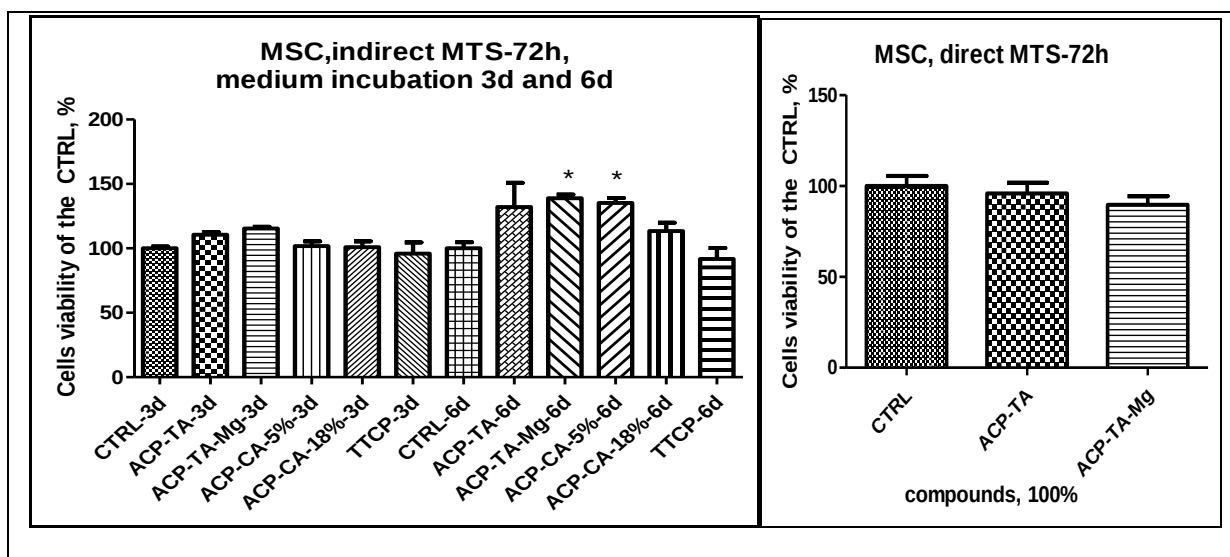
С помощта на флоуцитометричен анализ беше охарактеризиран фенотипа на изолираните от човешка адипозна тъкан клетки и бяха потвърдени стволите им характеристики. При провеждане на проучването, суспензията от единични клетки беше оцветена с белязани с флуорохром антители, разпознаващи човешки CD29, CD73, CD90, CD105, CD45, IgG1.

Направени бяха опити за предизвикване на остеогенна диференциация на МСК с помощта на т.нар. диференцираща хранителна среда на фирма HiMedia (Индия). За целта, след достигане на 3-5 пасаж част от клетките бяха култивирани в хранителна среда за остеогенна диференциация в присъствие на 10% ФТС. В края на стимулационния период, степента на остеогенна диференциация беше определена с прилагане на колориметричен метод за количествено отчитане на ензима алкална фосфатаза и чрез специфично оцветяване с ализарин ред за доказване отлагането на Ca^{2+} в екстрацелуларния матрикс. Проучванията бяха проведени при равни условия върху клетки, култивирани в конвенционална хранителна среда; конвенционална хранителна среда, модифицирана с изпитвания материал (АСР-ТА); в специална хранителна среда, насърчаваща диференциацията на стволови клетки към остецити; в специална хранителна среда, насърчаваща диференциацията на стволови клетки към остецити, модифицирана със съответния материал (АСР-ТА).

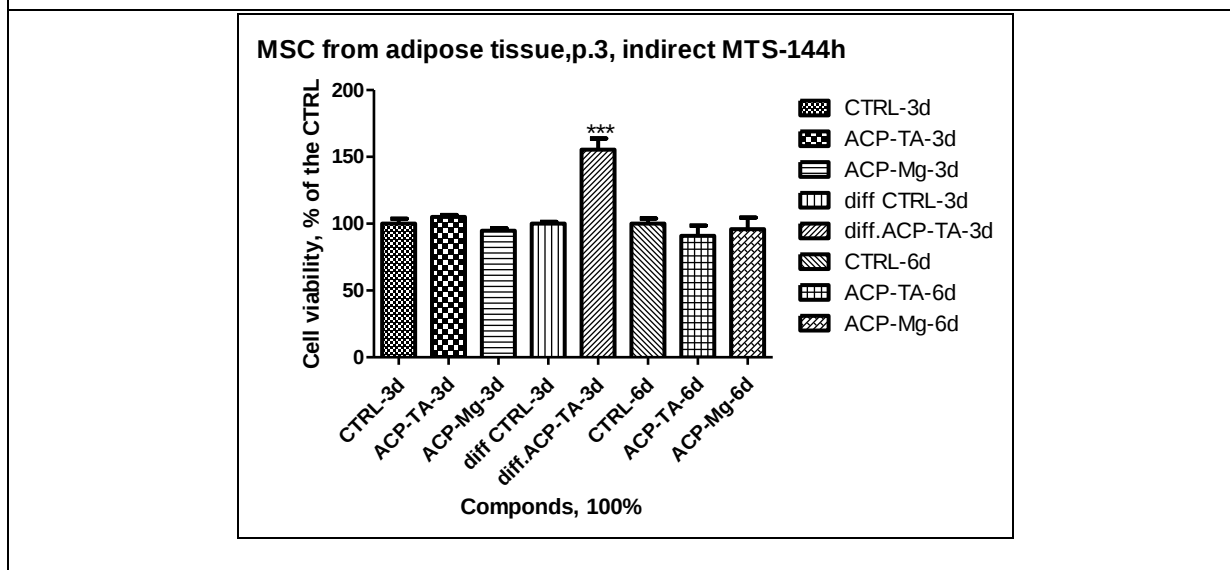
Чрез провеждане на директни и индиректни експерименти с MTS тест беше демонстрирана високата цитосъвместимост на изпитваните материали от Група 3 – Цименти на основата на аморфен калциев фосфат, включително на АСР-ТА и АСР-ТА-Mg, при човешките МСК (Фиг. 31-33). Най-висока преживяемост / пролиферативна активност беше намерен при МСК, култивирани в диференцираща остеогенна среда, инкубирана предварително в присъствие на АСР-ТА (Фиг. 30-36). Високата пролиферативна активност на МСК, култивирани в конвенционална среда (инкубирана предварително в АСР-ТА за 3 и 6 дена) и остеогенна диференцираща среда (инкубирана предварително в АСР-ТА за 3 и 6 дена) беше доказана и с имуноцитохимична реакция за визуализиране на експресията на ядрения маркер за пролиферация Ki-67 (Фиг. 34).

Липса на цитопатологични изменения в МСК, култивирани в продължение на 14 и 21 дена в конвенционална среда (инкубирана предварително в АСР-ТА за 3 дена) и остеогенна диференцираща среда (инкубирана предварително в АСР-ТА за 3 дена) беше установено след оцветяване с хематоксилин и еозин (Фиг. 35-36). В тези проби беше наблюдавано наличие на клетки, чиято морфология наподобява тази на остеобластите и остецитите. За разлика от това, в контролните ямки преобладават клетки с морфология характерна за прогениторните и стволовите клетки

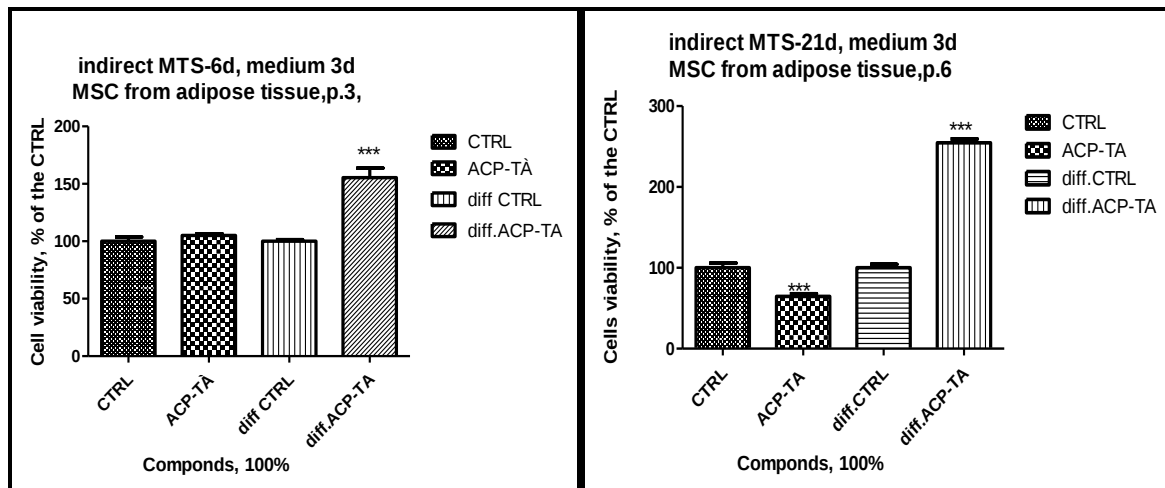
Двойното флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид потвърди отсъствието на цитопатологични изменения в третираните клетки в сравнение с контролите. Прави впечатление наличието на голямо количество ендозомни и лизозомални структури, характерно за мезенхимните стволовите клетки. Допускаме, че именно съдържащите се в ендозомите микро РНК молекули обуславят ярко червена флуоресценция в цитоплазмата на клетките. Известно е, че микро РНК играе важна роля в процеса на диференциация на стволовите клетки в остеобласти (37-39) (Julian L. M. and Stanford W. L., 2020). Оцветяването с ализарин ред разкри наличие на калциеви кристали в културите от МСК, култивирани в диференцираща остеогенна среда, както и в конвенционална и диференцираща остеогенна среда, инкубирана предварително в присъствие на АСР-ТА за 3 дни. Калциевите кристали са разположени екстрацелуларно и неравномерно, но се забелязват и зони на натрупване (точковидни и зърнестовидни) (Фиг. 39). Присъствието на минерала е най-добре изразено при клетки, култивирани в модифицирана с АСР-ТА диференцираща остеогенна среда. Степента на отлагане на минерала се засилва и с удължаване на периода на култивиране на клетките (най-добре изразено е на 21ия ден).



Фиг. 31. Влияние на АСР цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки МСК. Клетките са култивирани за 72 часа директно върху материала (директни експерименти) или в 100% КФМ среда, предварително инкубирана в присъствието на съответния материал за 3 и 6 дена (при индиректните експерименти). Проучването е проведено чрез MTS тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (* $P < 0.05$).



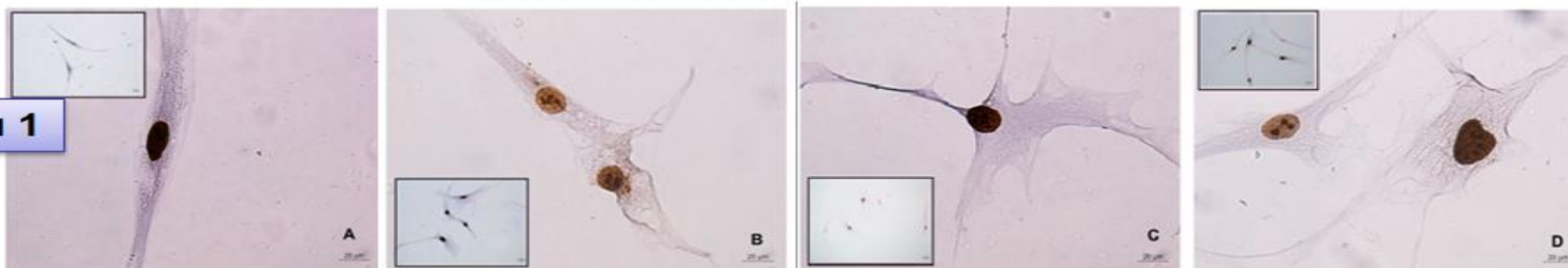
Фиг. 32. Индиректен експеримент за сравняване на влиянието на АСР цименти върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки МСК, култивирани за 72 часа в стандартна DMEM среда или диференцираща остеогенна среда (означена с diff.), в които съответният материал е инкубиран предварително за 3 и 6 дена. Проучването е проведено чрез MTS тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовите на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (***) $P < 0.001$).



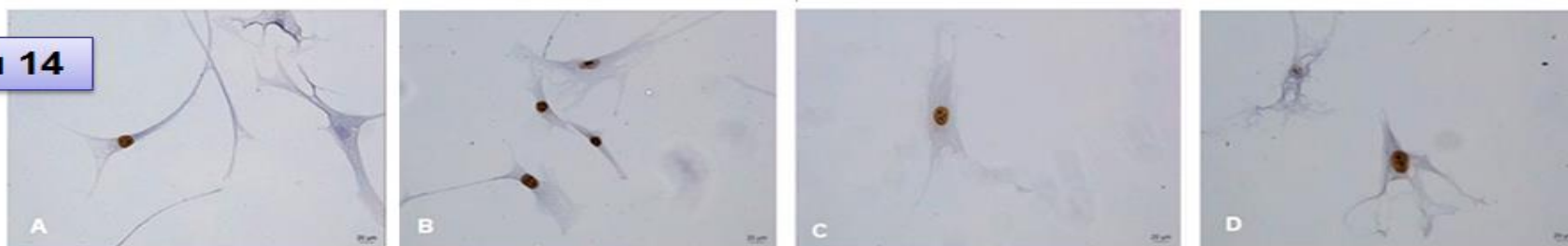
Фиг. 33. Преживяемост / Пролиферативна активност на човешки МСК, култивирани в продължение на 6 и 21 дена в: DMEM среда с 10% ФТС (CTRL); КФМ среда (DMEM среда с 10% ФТС), предварително инкубирана в продължение на три дена с АСР-ТА (АСР-ТА); диференцираща / остеогенна среда (diff. CTRL); диференцираща / остеогенна среда, която предварително е инкубирана в за 3 дена в присъствие на АСР-ТА (diff. АСР-ТА). Проучването е проведено чрез MTS тест. Нивото на значимост на разликите между отделните групи и контролата са определени с еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), следван от тестовете на Dunnet и Newman Keuls, с GraphPad Prism v.5.0. (***) $P < 0.001$.

Експресия на ядрения маркер за пролиферация Ki67

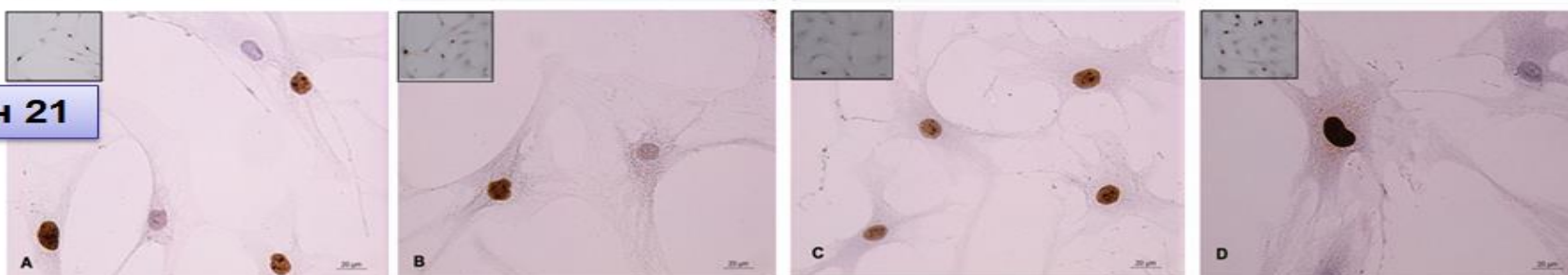
Ден 1



Ден 14



Ден 21



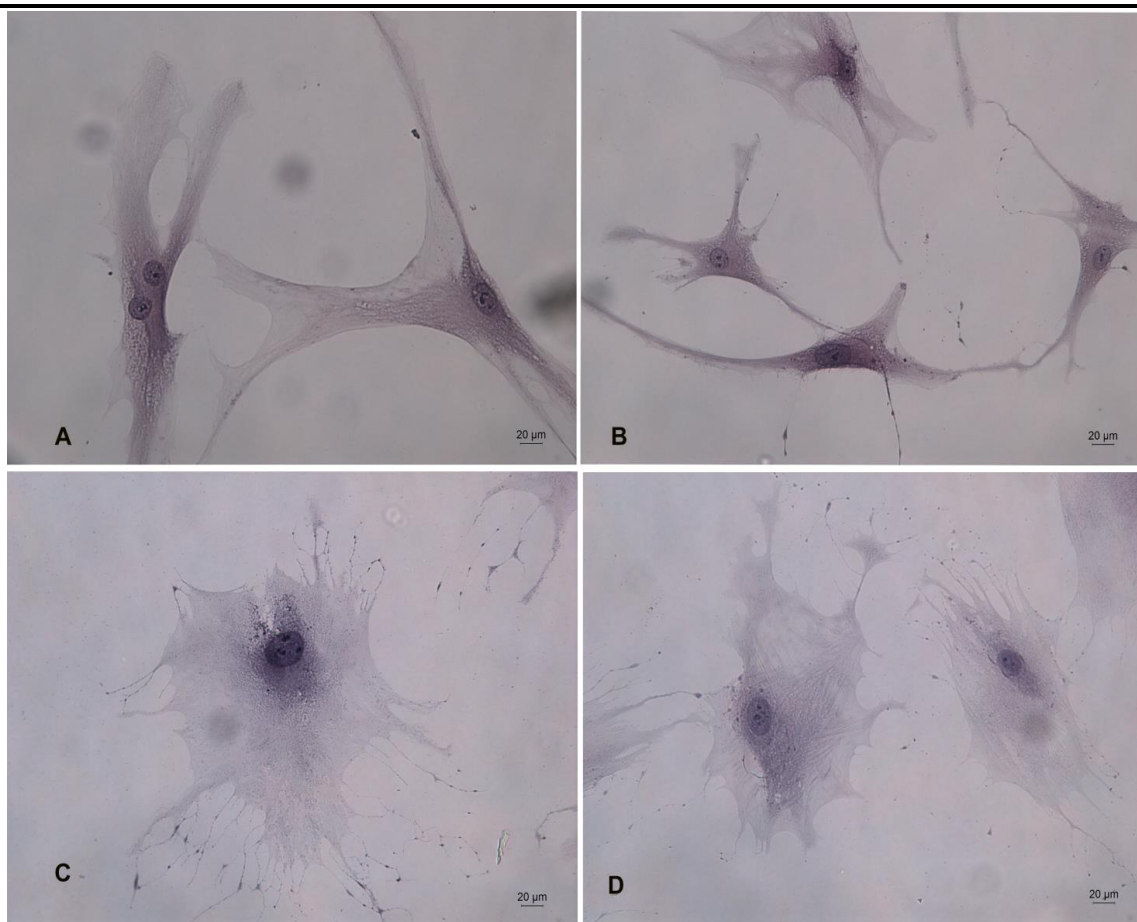
A- CTRL-3d

B- ACP-TA-3 d

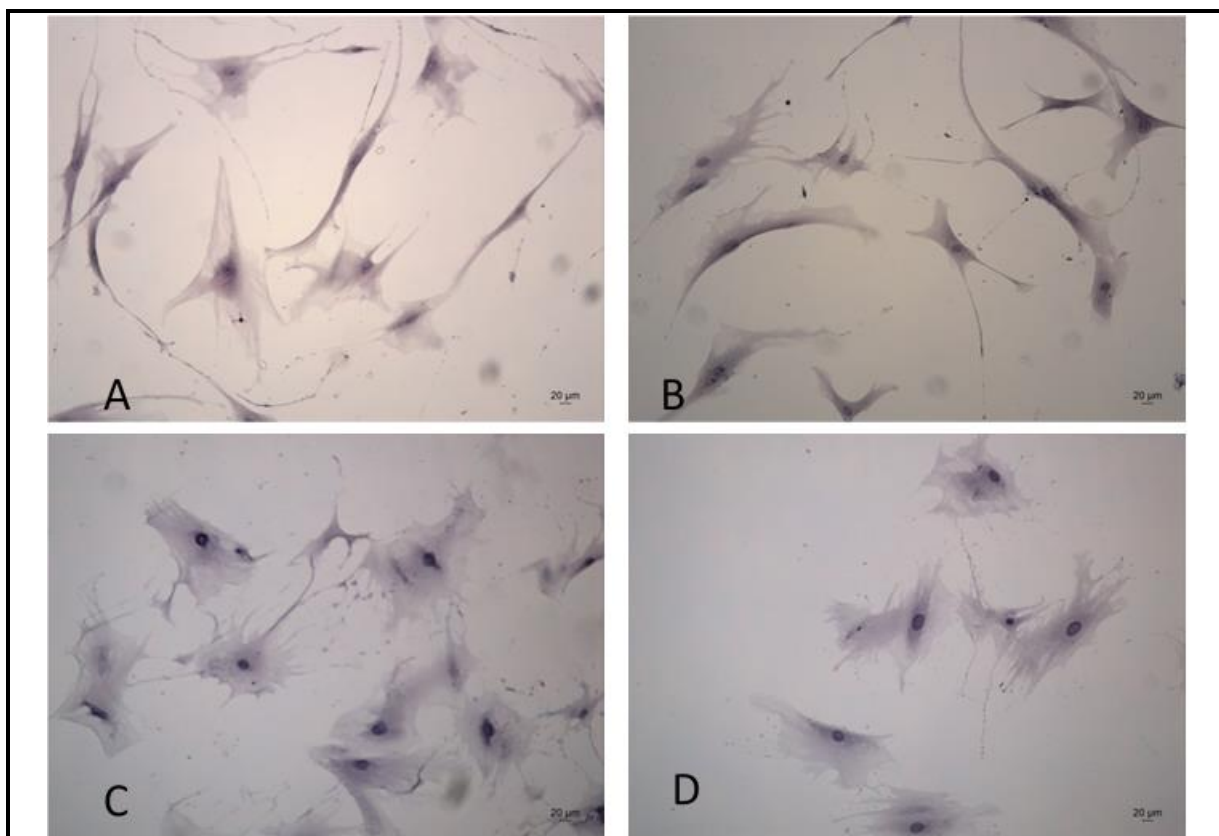
C – diff. CTRL-3d

D-diff.ACP-TA-3d

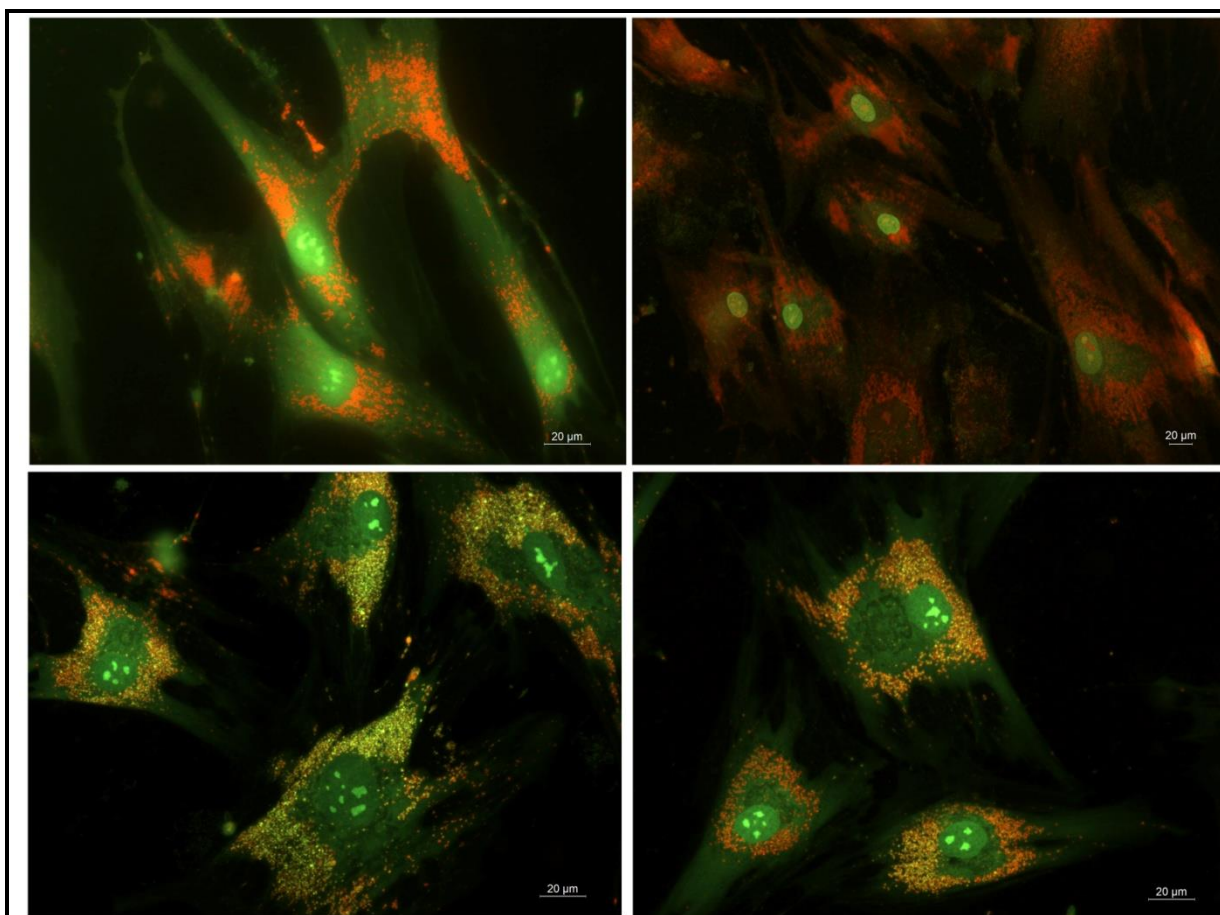
Фиг.34 Експресия на ядрения маркер за пролиферация Ki67 в човешки МСК от адипозна тъкан. Клетките са култивирани в продължение на 21 дена в – А-DMEM среда с 10% ФТС; В –КФМ среда, предварително инкубирана в продължение на три дена с АСР-ТА (DMEM-КФМ-АСР-ТА); С - диференцираща / остеогенна среда (ДОС); D - диференцираща / остеогенна среда, която предварително е инкубирана в за 3 дена в присъствие на АСР-ТА (ДОС-КФМ-АСР-ТА).



Фиг. 35. Първична култура от човешки мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан, култивирани в продължение на 14 дена в А- Контрола – DMEM среда с 10% ФТС; В –КФМ среда (DMEM среда с 10% ФТС), предварително инкубирана в продължение на три дена с АСР-ТА (DMEM-КФМ-АСР-ТА); С - диференцираща / остеогенна среда (ДОС); D - диференцираща / остеогенна среда, която предварително е инкубирана в за 3 дена в присъствие на АСР-ТА (ДОС-КФМ-АСР-ТА). Клетките са засети с концентрация 5×10^3 клетки на ямка / 6- ямкова плака. На фигурата се забелязва ясна разлика в морфологията на клетките, култивирани в DMEM (А) и (DMEM-КФМ-АСР-ТА) (В) в сравнение с клетките, култивирани в ДОС (С) и (ДОС-КФМ-АСР-ТА) (D). На А и В се наблюдават клетки с морфология, характерна за прогениторните и стволовите клетки, а на С и D – клетки, чиято морфология наподобява тази на остеобластите и остеоцитите. На всички фигури клетките са с интактна мембрана, добре оформено ядро, без нарушения в монослоя, откриват се и митози. Оцветяване с HE, микроскоп Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия



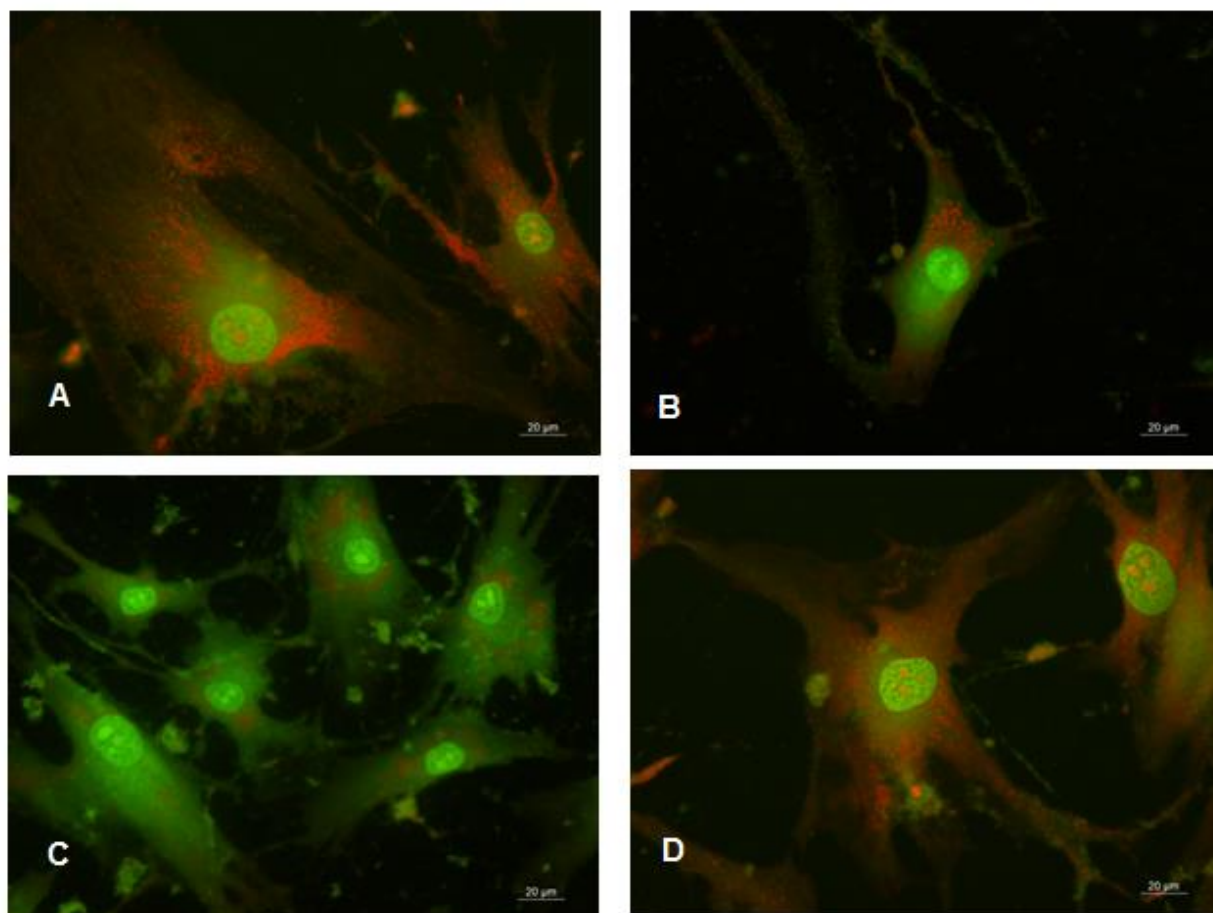
Фиг. 36. Първична култура от човешки мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан, култивирани в продължение на 21 дена в: А- Контрола – DMEM среда с 10% ФТС; В –КФМ среда (DMEM среда с 10% ФТС), предварително инкубирана в продължение на три дена с АСР-ТА (DMEM-КФМ-АСР-ТА); С - диференцираща / остеогенна среда (ДОС); D - диференцираща / остеогенна среда, която предварително е инкубирана в за 3 дена в присъствие на АСР-ТА (ДОС-КФМ-АСР-ТА). На фигурата се забелязва ясна разлика в морфологията на клетките, култивирани в DMEM (А) и (DMEM-КФМ-АСР-ТА) (В) в сравнение с клетките, култивирани в ДОС (С) и (ДОС-КФМ-АСР-ТА) (D). На А и В се наблюдават клетки с морфология характерна за прогениторните и стволовите клетки, а на С и D - клетки с остеобластно- и остеоцитноподобна форма. На всички фигури клетките са с интактна мембрана, добре оформено ядро, без нарушения в монослоя, наблюдават се и митози. Клетките са засети с концентрация 4×10^3 клетки на ямка / 6-ямкова плака. Оцветяване с HE, микроскоп, микроскоп Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия. Бар = 20µm



Фиг. 37. Човешки МСК от адипозна тъкан (пасаж 5), култивирани в продължение на 144 часа в: А- Контрола – DMEM среда с 10% ФТС; В –КФМ среда (DMEM среда с 10% ФТС), предварително инкубирана в продължение на три дена с АСР-ТА (DMEM-КФМ-АСР-ТА); С - диференцираща / остеогенна среда (ДОС); D - диференцираща / остеогенна среда, която предварително е инкубирана в за 3 дена в присъствие на АСР-ТА (ДОС-КФМ-АСР-ТА). Клетките са засети в концентрация 6×10^3 клетки на ямка / 6 ямкова плака.

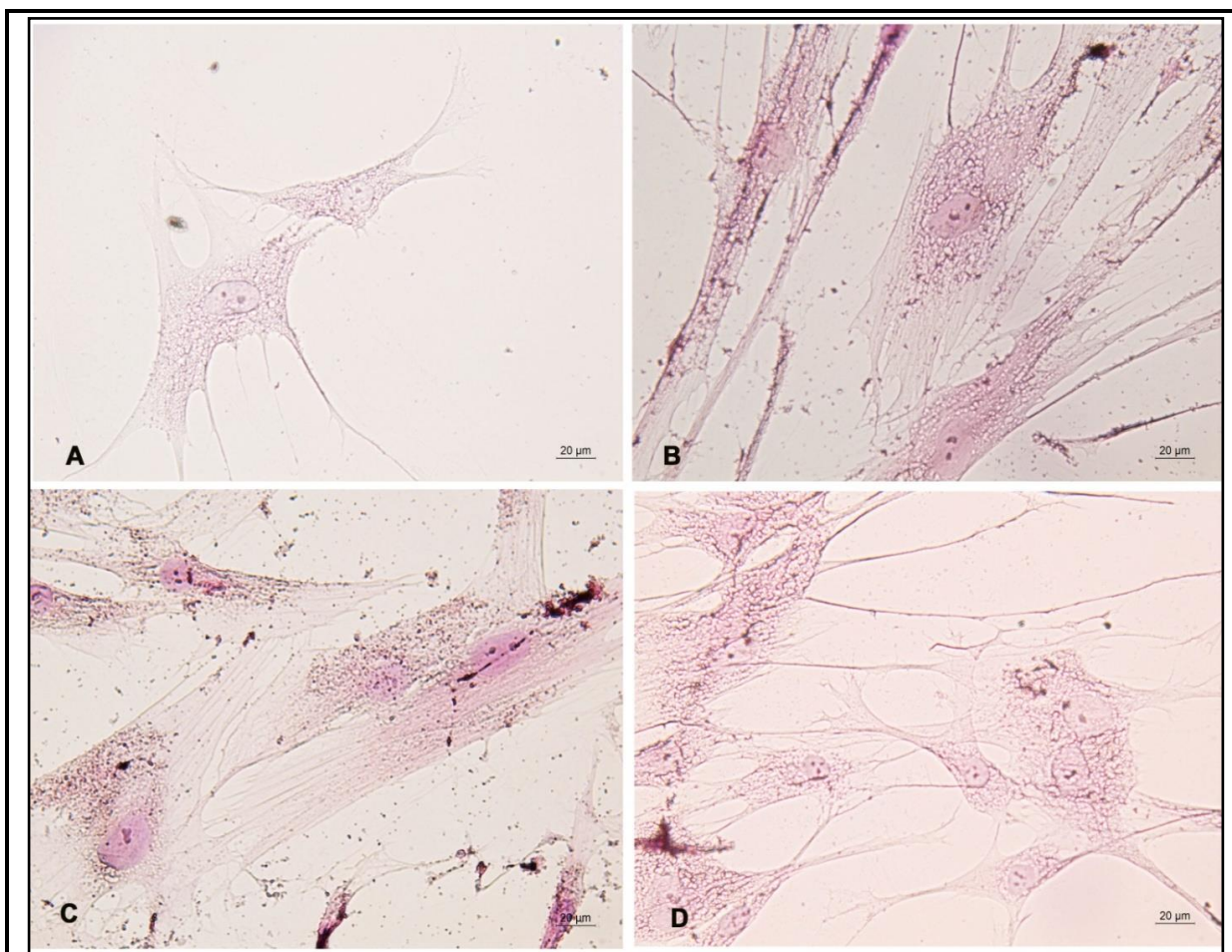
Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия. Бар = 20 µm.

Монослой от живи мезенхимни стволови клетки с бледозелена ядрена флуоресценция, ярко жълтозелени ядърца. Наблюдават се клетки със запазен интегритет на клетъчната и ядрената мембрана, компактен хроматин. В цитоплазмата се откриват голямо количество ендозомни и лизозомални структури, най-вероятно свързани с активността, синтетичните и диференциационните процеси, протичащи в МСК. Не се наблюдават цитопатологични изменения.

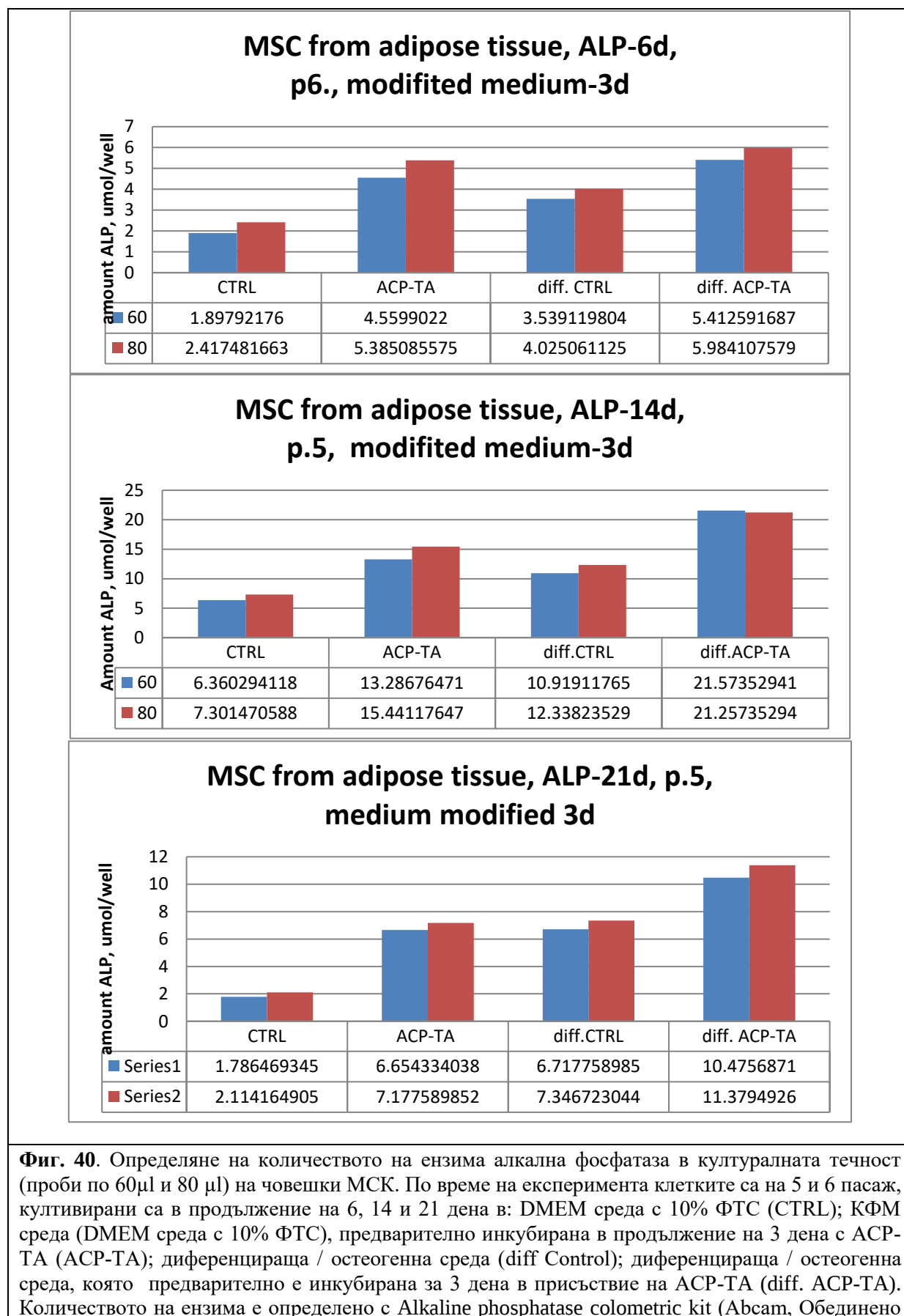


Фиг. 38. Човешки МСК от адипозна тъкан (пасаж 6), култивирани в продължение на 14 дена часа в: А- Контрола – DMEM среда с 10% ФТС; В –КФМ среда (DMEM среда с 10% ФТС), предварително инкубирана в продължение на три дена с АСР-ТА (DMEM-КФМ-АСР-ТА); С - диференцираща / остеогенна среда (ДОС); D - диференцираща / остеогенна среда, която предварително е инкубирана за 3 дена в присъствие на АСР-ТА (ДОС-КФМ-АСР-ТА). Клетките са засети в концентрация 4×10^3 клетки на ямка / 6 ямкова плака. Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия. Бар = 20 µm.

Монослой от живи мезенхимни стволови клетки с бледозелена ядрена флуоресценция, ярко жълтозелени ядърца. Наблюдават се клетки със запазен интегритет на клетъчната и ядрената мембрана, компактен хроматин. В цитоплазмата се откриват голямо количество ендозомни и лизозомални структури, най-вероятно свързани с активността, синтетичните и диференциационните процеси, протичащи в МСК. Не се наблюдават цитопатологични изменения.



Фиг. 39. Оцветяване с ализарин ред на култивирани в продължение на 21 дена човешки МСК от адипозна тъкан (пасаж 3) в: А- Контрола – DMEM среда с 10% ФТС; В –КФМ среда (DMEM среда с 10% ФТС), предварително инкубирана в продължение на три дена с АСР-ТА (DMEM-КФМ-АСР-ТА); С - диференцираща / остеогенна среда (ДОС); D - диференцираща / остеогенна среда, която предварително е инкубирана в за 3 дена в присъствие на АСР-ТА (ДОС-КФМ-АСР-ТА). Клетките са засети в концентрация 6×10^3 клетки на ямка / 6 ямкова плака. Отлагането на калциеви кристали е обозначено със стрелки (В,С,D). Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия. Бар = 20 μm ; По голямо количество на калциевите кристали се наблюдава в клетките култивирани в ДОС и ДОС-КФМ-АСР-ТА (С и D) в сравнение с Контролата - DMEM и DMEM-КФМ-АСР-ТА



кралство) съгласно инструкциите на Фирмата производител, реакцията е отчетена спектрофотометрично на micro-ELISA reader (TECAN, SunriseTM, Grodig/Salzburg, Austria) при дължина на вълната $\lambda=405$ nm.

VI. ОБСЪЖДАНЕ

Едни от най-сериозните предизвикателства при изпитването на цитосъвместимостта / биосъвместимостта *in vitro* на новосинтезирани материали за костни заместители са свързани с оформянето на цялостния експериментален дизайн, което включва избор на моделна система (клетъчна култура), начин на подготовка на пробата, време на въздействие, метод(и) за отчитане на резултатите и т.н.

Независимо от въведените международни стандарти за «Биологичното оценяване на медицински устройства» (ISO 10 993/2009, ISO 10993/2012 и ISO 10993/2018) и провеждащите се интензивни проучвания в тази област в редица лаборатории в цял свят, в достъпната литература липсва еднозначна схема за осъществяването на подобен род дейности. Ето защо, една от основните задачи пред всеки научноизследователски колектив е да оптимизира своята работа по такъв начин, че получените резултати да дадат максимално обективна и пълна информация за цитосъвместимостта / биосъвместимостта на изпитваните материали, предвиждайки максимално реалистично биологичното им поведение *in vivo*. Водени именно от това желание, ние предприехме редица стъпки в тази посока, които ще бъдат последователно описани и обсъдени в тази глава. Стъпка по стъпка, трупайки опит и надграждайки уменията си, ние за пръв път получихме данни за биосъвместимостта на 21 новосинтезирани материали за костни заместители от 3 различни групи, а най-обещаващите от тях (АСР-ТА) бяха включени в експерименти за стимулиране на остеогенната диференциация на човешки мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан.

Избор на експериментален модел

Възстановяването на костните дефекти е комплексен процес, в който взимат участие не само изграждащите костта клетки и техните предшественици, но и (в по-голяма или в по-малка степен) останалите тъкани и системи на организма (например кръвоносна, ендокринна, нервна). От друга страна, веднъж въведен на костта и да е място в тялото, включително в костен дефект, даден материал повлиява не само върху намиращите се в непосредственото му обкръжение клетки, но върху целия организъм.

Тези две съображения според нас трябва да бъдат взети под внимание при избора на клетъчни култури за изпитване на цито/биосъвместимостта на новосинтезирани материали за костни заместители. Тези и други съображения бяха определящи при решението ни да използваме следните експериментални модели при подготовката на представения Дисертационен труд:

- Човешки ембрионални клетки от линии Lep-3, MRC-5, BJ. Известно е, че ембрионалните клетки се характеризират с ниска степен на диференциация и висока пролиферативна активност – качества, които са характерни и за клетките, вземащи участие във възстановяването на костните дефекти. В същото време ембрионалните клетки са силно чувствителни към промените в обкръжаващата ги микросреда, което ги превръща в отличен модел за оценяване цитотоксичността на синтетични материали и природни продукти. Допълнително предимство на клетките от щам MRC-5 е, че тези клетки са диплоидни, т.е. пресъздават в максимална степен биологията на човешките клетки, тъй като при тях липсват характерните за постоянните клетъчни линии генетични, а съответно и биохимични изменения натрупани в хода на лабораторното им култивиране. Именно ограниченият брой пасажи, който клетките от щам MRC-5 могат да преживеят, е причина за ограничения брой експерименти с тях.
- Фибробласти (миша линия BALB/c 3T3). Тези клетки запълват костния дефект със съединителна тъкан, която по-късно се разгражда от остеокластите, за да бъде заменена с костна тъкан от остеобластите (Ванков, Гълъбов, 1990).
- Култури от експланти от бедрена кост на мишка, които при включването им в експериментите бяха на 7-8 пасаж. Подобни (намиращи се в ранни пасажи) култури имат редица предимства пред постоянните клетъчни линии. Неслучайно ISO 10 993 препоръчва при оценяването на потенциалната цитотоксичност да бъдат включени и първични култури. Нека припомним, че те в максимална степен отразяват биологичното поведение на клетките, от които са получени. За сравнение, в резултат от многократното пасиране и продължително култивиране в лабораторни условия, при постоянните клетъчни линии се наблюдават редица промени

– в кариотипа, биохимичните свойства и др. От такава първична култура от костен експлант на мишка беше получена и линия, преминала повече от 60 пасажа. Някои от експериментите бяха проведени с нея (клетките се намираха на 14-58 пасаж). Предимствата на такава клетъчна линия са нейната постоянна наличност и възможността за получаване на сравними резултати.

- Човешки клетъчни линии, получени от карциноми на млечната жлеза (MCF-7) и шийката на матката (HeLa). Решението ни да включим в експериментите тези две линии беше продиктувано от факта, че костите са една от предпочитаните локализации за метастазиране при неоплазии на гърдата и шийката на матката. Вследствие на заболяването (туморните лезии) и/или неговото лечение (прием на антиестрогенови препарати при хормонално-зависим рак на гърдата, благоприятстващи развитието на остеопороза) при такива пациенти често се наблюдават костни дефекти, чието възстановяване има важно значение за повишаване качеството на живота.
- Специално внимание заслужава линия SAOS-2, която е получена от остеосарком у човек. Макар и злокачествено трансформирани, тези клетки имат остеогенен произход. Да не забравяме и за някои общи характеристики (включително използване на общи сигнални пътища) между стволовите клетки и туморните клетки, най-добър пример за което са т.нар. ракови стволови клетки.
- Получена от бъбречни клетки на здраво теле, линия MDBK е модел за изучаване на нефротоксичност в условия *in vitro* – оделяните при съприкосновението на телесните течности с импланта атоми и молекули в крайна сметка може да достигнат до бъбрека;
- Култури от костен мозък (на мишка и плъх), даващи възможност да се проследи влиянието на изпитваните материали върху съвкупността от хематопоеични и т.нар. мезенхимни стволови клетки, които по-нататък дават началото на клетките, изграждащи кости и хрущяли. В хода на проведените от нас експерименти бяха направени и опити за изолирани и култивиране на мезенхимни стволови клетки от костен мозък на мишка, като получените уроци ни бяха изключително полезни в по-нататъшните

работа, свързана с човешки мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан.

- Човешки МСК от адипозна тъкан. Мезенхимните стволови клетки са едни от основните инструменти на тъканното инженерство. Масните стволови клетки (АСК) притежават някои специфични характеристики, които ги правят особено подходящи за нуждите на костното тъканно моделиране. Така например, в сравнение с изолираните от костен мозък стволови клетки АСК имат следните предимства: 1) те могат да бъдат получени в големи количества, което улеснява осигуряването на необходимия брой за тъканно-инженерни техники и намалява усложненията, съпътстващи продължителното култивиране в лабораторни условия; 2) по-изразена способност да стимулират образуване на кръвоносни съдове (проангиогенна активност); 3) по-висока генетична стабилност в дългосрочни култури (Meza-Zepeda et al., 2008; Dahl et al., 2008; Alexandrova et al., 2018). АСК произвеждат биологично активни молекули, които играят важна роля в костната регенерация / ремоделиране (костни морфогенни протеини-2 и -4; активатор на рецептора на лиганда на ядрения фактор κ B лиганд - RANKL; фактор, стимулиращ колонии-образуващата способност на макрофагите; фибронектин; колаген тип I); зарастването на рани (фибробластен растежен фактор-2; кератиноцитен растежен фактор; инсулиноподобен растежен фактор-1) и ангиогенезата (съдов ендотелен растежен фактор - VEGF, инсулиноподобен растежен фактор-1; матриксни металопротеиназни ензими MMP-3 и MMP-9; интерлевкин-8). Получените от цитоплазмената мембрана везикули (ЦМВ), секретирани от АСК, им позволяват да влияят на поведението на други (прицелни) клетки, разположени не само в съседство (паракринни ефекти), но и на отдалечени места в тялото, стимулирайки техните пролиферация и диференциация, както и регенеративните и репаративните процеси. Тези ЦМВ съдържат и доставят различни растежни фактори, цитокини, РНК и микроРНК. Не на последно място, АСК могат да оцелеят при условия на хипоксия, което ги прави изключително ценни за костното тъканно моделиране, тъй като ограниченият приток на кръв към импланта може да бъде

предизвикателство (Follmar et al., 2006; Ciuffi et al., 2017; Alexandrova et al., 2018).

Начин на подготовка на пробата

Ще бъдат разгледани основно материалите от Група 1 (Прахови образци), тъй като именно с тях започна работата ни в тази област, когато усилията ни до голяма степен бяха съсредоточени върху оптимизирането на експерименталната постановка.

Начинът на подготвяне на пробата, съответно получаването на т.нар. 100% модифицирана с КФМ среда при материалите от Група 1 – Прахови образци, беше осъществено, както е описано от Стаматова (2009). В същото време бяха направени и някои модификации. Те бяха предприети основно в две посоки:

1. Инкубирането на среда в присъствие на КФМ продължи не само 4 часа (Стаматова, 2009), но и 8 и 24 часа. Сравняването на получените резултати не показва съществени различия в преживяемостта и/или пролиферативната активност на използваните като модели клетъчни линии (Lep-3, BALB/c 3T3), поради което в останалите експерименти беше използвана основно среда, инкубирана 4 часа със съответния КФМ.
2. С оглед получаването на по-детайлни данни за продължителното въздействие на изпитваните материали върху преживяемостта и растежа на клетките, култивирането им в присъствие на 100% КФМ среда продължи не само 24-48 часа (Стаматова, 2009), но и 72-144 часа. Нещо повече, предприети бяха допълнителни проучвания, при които клетките бяха култивирани продължително (21 дена) и пасирани (8 пъти) в присъствието на 100% модифицирана с Mg7-КФМ среда.

Модифицираната с КФМ среда при материалите от Група 1 (Прахови образци) беше получена при инкубиране на хранителната среда в присъствие на разстлан върху стъклена плочка тънък пласт от изследваното вещество (виж т. V.2.1., Раздел Материали и Методи). Логично е да се предположи, че по време на тази инкубация от материала в средата преминават определени йони и молекули, а при последващите тестове се оценява именно тяхното влияние върху клетъчните растеж и преживяемост. Именно това би се случило и в реални условия – телесните течности биха поемали (отмивали) молекули и йони от костния имплант. От една страна това показва адекватността на

подбраната от нас постановка на опита. От друга страна обаче, възникват и някои допълнителни въпроси, като:

- 1) Какво точно и в какви количества се отделя от изпитваните от нас прахови образци (както и от останалите материали), т.е. какво всъщност представлява и какво съдържа т.нар. „100% модифицирана среда”? До момента подобно изследване не е правено, но определено представлява интерес.
- 2) Фактът, че при проведените от нас експерименти със среда, инкубирана в течение на 4, 8 и 24 часа в присъствие на съответния материал не бяха наблюдавани съществени отклонения в преживяемостта на третираните клетки, означава ли, че след определен момент (например 4^{ия} час) отделянето на йони и молекули от материала се преустановява?
- 3) Наред с оценяването на цитотоксичността на подобна модифицирана среда е необходимо да се установи и директното влияние на материала върху растежа и преживяемостта на клетките. С други думи казано, необходимо е да се планират и проведат експерименти, които да покажат дали и до колко тестираните вещества биха позволили върху повърхността им да се поселят и да растат клетки, особено такива, участващи в остеогенезата.

Подобни експерименти бяха осъществени с материалите от Група 3 (Цименти), като за целта те бяха синтезирани под формата на „таблетки“, чийто диаметър отговаря на размера на ямките в 48-ямковата плака. За определянето на цитосъвместимостта им беше използван MTS тест, вместо класическия MTT тест – макар и двата метода да се основават на общ механизъм (биологична активност на митохондриални ензими), получаваният при MTS теста продукт е разтворим, което намалява броя на стъпките в протокола и отпада необходимостта от промиване на клетките в последния етап. Проведен беше и СЕМ анализ, който демонстрира способността на клетките да прилепват по повърхността на изпитваните материали от тази група (АСР-ТА, АСП-ТА-Mg, АСП-СА-5%. ТТСР) и да пролиферират, включително и във вътрешността на материала.

Различна гъстота на засяване на клетките

При засяването на клетките (линии Lер3, BALB/с 3Т3, HeLa) с различна начална гъстота (2×10^4 , 1×10^4 , 0.5×10^4 ; 0.25×10^4) с намаляване на началната концентрация на клетките се наблюдаваше известно понижаване на процента на живите клетки спрямо контролата, като в някои случаи тези разлики бяха статистически достоверни ($p < 0.05$, Виж Фиг. 32А,32Б и 33, 34 – да цитираме). Тази зависимост най-вероятно може да се обясни със способността на клетките да секретират биологично активни вещества, стимулиращи, както собствената им пролиферация, така и тази на обкръжаващите ги клетки, което на свой ред се отразява и върху тяхната пролиферативна активност – засетите в по-голяма гъстота клетки се делят по-интензивно.

Прилагане на методи с различни клетъчни мишени и механизми на действие

С цел получаване на по-пълна информация за биосъвместимостта на изпитваните КФМ при проведените от нас експерименти бяха използвани 4 цитотоксични методи с различни клетъчни мишени (молекули, органели) и механизми на действие: МТТ тест (основан на способността на сукцинат дехидрогеназа във функционално активните митохондрии в живите клетки да редуцира тиазол блу тетразолиев бромид до формазан); метод за включване на неутрално червено (основно багрило, което прониква в клетките и се натрупва в киселите им структури – лизозоми, а вероятно и в Апарата на Голджи), оцветяване с кристал виолет (обагрят ДНК) и оцветяване с трипаново синьо (прониква през нарушената цитоплазматична мембрана и оцветява в синьо само мъртвите клетки). Независимо от много добрата съпоставимост на експерименталните данни, получени чрез едновременно провеждане на четирите метода (Виж Фиг. 27-31,40; 43,44 и Табл. 16, 17), смятаме, че при изследване на цито- / биосъвместимостта на новосинтезирани съединения задължително трябва да се използва не един, а комплекс от методи. Известно е, че върху успеваемостта и адекватността на даден цитотоксичен метод влияние може да оказат и някои химични и физико-химични характеристики на тестираното вещество, както и особеностите на взаимодействието «вещество-клетка».

Материали от група 1 – Прахови образци

Като цяло, съдържащите Zn(II) или Mg(II) калциево фосфатни материали не повлияват съществено преживяемостта и пролиферативната активност на култивираните в тяхно присъствие в продължение на 72 и 144 часа човешки

ембрионални и миши фибробластни клетки. Така например, процентът на живите клетки спрямо контролата варираше между $59.45\% \pm 4.4$ (при Zn7) и $111.4\% \pm 11.7$ (при Mg13) ($p > 0.05$) след 72 часово култивиране на клетки от линия Lep3 в присъствие на 100% модифицирана с КФМ среда (Фиг. 13-16). Сравнително по-ниска преживяемост беше наблюдавана при Zn-7 (59.45 , $P < 0.01$).

Тези резултати бяха потвърдени при провеждането на МТТ тест (отчитащ функционалната активност на митохондриите), тест за включване на неутрално червено (основан на способността на живите клетки да включват багрилото в лизозомите и апарата на Голджи) и оцветяване с кристалвиолет (чиято интензивност отразява броя на ядрата/клетките).

Интересът към модифицираните с метални йони (и по-специално Zn и Mg) съвсем не е случаен. И двата метала са есенциални и изпълняват важни биологични функции в организма на животните и човека (Alexandrova et al., 2002). Доказано е, че цинкът оказва стимулиращо въздействие върху образуването на костите. Проведени *in vitro* проучвания разкриват, че този метал активира пролиферацията на остеобластите (Hashizume, Yamaguchi, 1993) и има силен и селективен потискащ ефект върху способността на остеокластите да резорбират костта (Kishi, Yamaguchi, 1993, 1994; Moonga, Dempster, 1995). *In vivo* изпитване на Zn-съдържащи калциеви фосфати върху костни дефекти при зайци показват около 50 % повече новообразувана кост в сравнение с несъдържащите цинк калциево фосфатни материали (Kawamura et al., 2000). Други автори съобщават за наличие на връзка между склонността към развитие на остеопороза и недостига на Zn във възрастни индивиди (Hyun et al., 2004). През последните години беше установено, че Zn-съдържащи калциево фосфатни керамики показват много добра биосъвместимост. Цинкът може да инкорпорира в хидроксиапатит (НА) чрез заместване на Ca (Sogo et al., 2004; Storrie, Stupp, 2005; Fujii et al., 2006). Освобождаването на Zn от такива Zn-съдържащи хидроксиапатити става много бавно поради ниската разтворимост на НА. Zn-съдържащи трикалциеви фосфат (TCP) също са обект на интензивни проучвания (Kawamura et al., 2003; Otsuka et al., 2004; Ito et al., 2002, 2005; Tas et al., 2007). Получените резултати показват, че тези материали проявяват стимулиращ ефект върху активността на остеобластите и формирането на костта, но също така сигнализират и за някои проблеми. Така например, трикалциевите фосфати (TCP) имат висока разтворимост и лесно се резорбират както *in vitro*, така и *in vivo*. Този процес се съпътства от освобождаване на високи нива цинк, което може да предизвика токсични

реакции (Kawamura et al., 2000; Bandyopadhyay et al., 2007). Цинкът е абсолютно необходим за функционалната активност на т.нар. матриксни металопротеинази (ММП), които участват в разграждането на извънклетъчния матрикс. ММП са включени в осъществяването на редица нормални и патологични процеси, като действието им може да допринесе за развитието на пародонтоза. Този факт без съмнение трябва да се има предвид при използването на цинка в цименти за нуждите на стоматологичната практика (Alexandrova, Nikolova, 2002).

Магнезият е един от най-важните фактори за оформянето на костния матрикс и има съществено значение за чупливостта на костите. Намаленото съдържание на Mg оказва вредно въздействие върху всички стадии на скелетния метаболизъм и е причина за забавяне на костния растеж и намаляване на функционалната активност на остеобластите и остеокластите (Percival, 1999). Mg може да бъде включен в структурата на TCP чрез заместване на Ca (Dickens, 1974; Schroeder et al., 1977; Yoshida et al., 2005; Enderle et al., 2005) и подобрява тяхната термичната стабилност. Включването на Mg забавя темпа на разграждане на TCP - доказано е, че разтворимостта на Mg-съдържащите TCP намалява с увеличаване на съдържание то на Mg (Lin et al., 2001; Tardei et al., 2006)

По отношение на сравнително по-високата токсичност на съдържащите Zn-КФМ (особено Zn7 – КФМ) в сравнение с Mg-КФМ заслужава да се отбележи фактът, че токсичната доза на цинка (75 mg/24h) е по-ниска в сравнение с тази на Mg (8.7 g/24h) (<http://www.innvista.com/health/anatomy/elements.htm>). Защо обаче точно Zn7-КФМ показва цитотоксичност, а не Zn13-КФМ, който е с по-високо съдържание на този метал, е въпрос, чийто отговор предстои да бъде потърсен.

Добра цитосъвместимост беше наблюдавана и при модифицирания със стронций материал D3. Предклинични и клинични проучвания предоставят доказателства, че Sr (под формата на стронциев ранелат) оказва благоприятно въздействие върху костната маса и устойчивост при животински модели на костна загуба и при пациенти с остеопороза. Тези ефекти са медиирани отчасти от фармакологичните действия на стронция върху костния метаболизъм, чрез намаляване на костната резорбция и поддържане или увеличаване на костното образуване. Наличните към момента данни показват, че стронцият активира множество сигнални пътища в костните клетки, на които се основават фармакологичните му ефекти. По-специално, активирането на калциево-чувствителния рецептор в остеокластите или остеобластите води до

стимулиране на фосфолипаза С β , инозитол 1,4,5-трифосфат, освобождаване на вътреклетъчен Ca $^{2+}$ и активиране на MAPK ERK1 / 2 и Wnt / NFATc сигналните пътища. По този начин Sr повлиява 1) активността на ключови молекули, като RANKL и OPG, които контролират костната резорбция; 2) регулацията на гените, насърчаващи пролиферацията, диференциацията и оцеляването на остеобластните клетки. Изследванията в тази област са необходими с оглед на потенциалното терапевтично приложение на стронция и неговите съединения при лечението на свързаната с възрастта костна загуба и евентуално други нарушения (Saidak et al., 2012).

Материали от група 2 – Композитни материали

Изследваните от нас композитни материали показват добра цитосъвместимост - тя е потвърдена при изпълнение на различни цитотоксични тестове (MTT тест, метод за включване на неутрално червено и оцветяване с трипаново синьо) при човешки (ембрионални фибробластни клетки от линия Lер-3), миши (ембрионални фибробласти от линия BALB/c 3T3 и първични култури от костен мозък) и плъши (костномозъчни) клетки. Процентът на живите миши и плъши КМК клетки спрямо контролата нараства с удължаване на времето на култивиране, както и с увеличаване на количеството на материала. Получените от нас данни бяха потвърдени *in vivo* (Dimitrov P. et al., 2012)

Материали от група 3 – Цименти

- От изпитваните материали с относително най-добра био/цитосъвместимост (влияние върху прилепване, преживяемост и пролиферация на клетките) се отличават:

- Аморфен калциев фосфат с винена киселина (АСР-ТА);
- Аморфен калциев фосфат с винена киселина и магнезий (АСР-ТА-Mg)
- Тетракалциев фосфат (ТТСР)

Тя е потвърдена при директни и индиректни експерименти с различни клетъчни култури (първични култури и постоянни клетъчни линии, туморни и нетуморни клетки, растящи в монослой и в суспензия, включително миши костномозъчни клетки и култури от костни експлантати, човешки МСК) с цитотоксични тестове (MTT тест / MTS тест и оцветяване на мъртвите клетки с трипаново синьо) и сканираща електронна микроскопия, като активността им е проследена от 4 час (при непреките експерименти) до 10 ден (при директните експерименти – в случая СЕМ) и 21 ден (при непреките

експерименти е използвана модифицирана хранителна среда, инкубирана три седмици в присъствието на съответните материали).

По-високата цитотоксичност на аморфните калциеви фосфати с лимонена киселина (АСР-СА) и особено с млечна киселина (АСР-LA) (Не всички данни са представени) може да се дължи на понижаване на рН (възможно е да се дължи на остатъчна киселина в крайния продукт) – известно е, че клетките са силно чувствителни към промените в рН. Цитотоксичността на модифицирания с лимонена киселина АСР нараства с увеличаване на съдържанието ѝ – процентът на живите клетки спрямо контролата е по-висок при АСР-СА-5% в сравнение с АСР-СА-18%.

- Установено беше също така, че върху биологичното поведение на материалите и преживяемостта на клетките влияят много фактори, сред които:

- ☐ Гъстотата, с която клетките са посети (при увеличаването ѝ се стимулира клетъчният растеж)
- ☐ Количеството на материала (при по-голям обем/маса на материала се наблюдава по-висок процент живи клетки в сравнение с контролата)

Висока цитотоксичност показва модифицираният с Na материал - преживяемостта на клетките, култивирани в присъствие на АСР-TA-Na е под 10%. Причината, обуславяща повишената токсичност на този материал за момента не е установена. Възможно е да е следствие на биологичната активност на този елемент, който взема участие в различни биохимични реакции. Нарушението в равновесието му и смущенията в баланса между Na и K се свързват с различни патологични състояния (например т.нар. каналопатии), включително високо кръвно налягане, сърдечна недостатъчност, смущения във функциите на мозък и др. (Head C, Gardiner et al., 2003; Olson et al., 2005; Adrogué, Madias, 2014; Smiljanec, Lennon, 2019).

Предполага се, че т.нар. епителен натриев канал (ENaC) участва в регулирането на диференциацията на остеокластите и костната резорбция и играе важна роля за функционалната активност на тези клетки. Допуска се, че става дума за нов сигнален път с важно значение за костния метаболизъм (Hu et al., 2016).

Наблюдаван беше клетъчно-специфичен отговор. Така например, човешките ембрионални клетки от линия BJ и клетките от остеогенен сарком у човек SAOS-2 показват по-висока чувствителност към изпитваните материали в сравнение с човешките ембрионални клетки от линия Lep-3.

Това още веднъж илюстрира необходимостта от прилагане на различни моделни системи при изпитването на био/цитосъвместимостта на нови материали за костни импланти. Особено подходящи за тази цел са използваните от нас култури от костни експланти, както и костно-мозъчни клетки от мишка. Първите предизвикват интерес с това, че при получаването им се наподобява във висока степен регенерацията на кост в лабораторни условия, а вторите се характеризират с висока чувствителност към действието на широк кръг химични агенти, тъй като а) не експресират или експресират в съвсем слаба степен т.нар. П-гликопротеин (PGP, който е отговорен за изпомпването на ксенобиотици от клетката) и б) съдържат стволови, включително мезенхимни стволови клетки.

Проведени бяха проучвания с помощта на сканираща електронна микроскопия (SEM) върху способността на клетките (миши фибробласти клетки от линия BALB/c 3T3, ембрионални човешки клетки от линия Lер-3 и клетки от остеогенен сарком у човек – линия SAOS-2) да се поселват и да пролиферират върху и в изпитваните материали от група 3. Получените резултати са показани на Фиг. 94-104.

Изследванията потвърдиха способността на изпитваните материали да благоприятстват прилепването (адхезията), преживяването и пролиферацията на култивираните върху тях клетки

С цел получаване на по-пълна информация за цитосъвместимостта на изпитваните материали за костни импланти от групи А и В, бяха проведени и директни експерименти с човешки клетки от линия ВJ от кожа на новородено момче. Получените резултати са представени на Фиг. 80.

Прави впечатление, че процентът на живите клетки от линия ВJ (Фиг. 80), култивирани върху АСР-ТА и АСР-ТА-Mg, е по-нисък в сравнение с този при ембрионалните човешки фибробласти от линия Lер-3 (Фиг. 76). Това различие би могло да се дължи на поне две причини: 1) различната продължителност на експериментите – 72 часа при клетъчна линия Lер-3 и 144 часа при клетките от линия ВJ; 2) въпреки че и двете линии (ВJ и Lер-3) са с човешки произход, всяка една от тях има своите индивидуални характеристики, които определят биологичното им поведение.

При сравняване на резултатите за процента живи клетки (спрямо контролата) от линия Lер-3, култивирани върху повърхността на материали (директни експерименти) в продължение на различни интервали от време – 72 и 96 часа (Фиг. 79), прави

впечатление, че преживяемостта на АСР-ТА, АСР-ТА-Mg и ТТСР остава висока и на 96 час, докато при АСР-5% и особено при АСР-18% - намалява.

При провеждането на директния експеримент клетките от линия BALB/c 3T3 бяха култивирани върху предварително поставени на дъното на 48-ямкови плаки материали. Процентът на живите клетки спрямо контролата беше отчетен на 4, 5 и 6 ден (при АСР-ТА) и 4 часа, 24 часа, 3 и 6 ден (при АСР-ТА и АСР-ТА-Mg).

Получените и чрез двата експериментални подхода (директен, индиректен) данни показваха добра преживяемост, като броят на живите клетки се доближава (АСР-ТА и АСР-ТА-Mg, Фиг. 60) и дори надвишава (АСР-ТА, Фиг. 61) този в контролата.

При оценяването на резултатите от директните експерименти не бива да се забравя, че за контрола служат клетки, които растат върху плаката, което е изработено от специална пластмаса, фабрично обработена с цел стимулиране на клетъчната адхезия. Това би могло да обясни, поне отчасти, по-ниският процент на живите клетки върху материалите в сравнение с контролата (Фиг. 63). В същото време обаче, процентът на живите клетки нараства с удължаването на интервала на култивиране.

Статистически значими разлики в процента живи клетки култивирани върху АСР-ТА и АСР-ТА-Mg не беше наблюдаван (Фиг. 60 -61).

Сравняване чувствителността на клетки към въздействието на изпитваните материали

При провеждането на експериментите бяха използвани клетъчни култури с различен произход – човешки, миши, плъши, говежди; туморни (карциноми на гърда и маточна шийка, остеосарком у човек) и нетуморни (ембрионални, хематопоеични, фибробласти, МСК), първични култури и постоянни клетъчни линии. Сравнително високата чувствителност на костномозъчните клетки към цитотоксичното действие на изпитваните КФМ може да се обясни поне отчасти с липсата или слабата експресия на т.нар. PGP – продукт на гена *mdr1*. PGP е АТФ-зависима ефлукс помпа, която участва в изхвърлянето на ксенобиотиците от клетката (Alexandrova, 1998; Silva et al., 2015).

При паралелното използване на човешки ембрионални (Lep 3) и миши фибробластни (BALB/c 3T3) клетки бяха получени сходни резултати – факт, който има важно значение, като се има пред вид високата цена и трудната достъпност на клетки (особено първични култури) с човешки произход.

Остеоиндуктивност

За провеждане на проучвания върху остеоиндуктивния потенциал се спряхме на материала АСР-ТА, който беше предпочетен пред другите два показали висока цитосъвместимост материали АСР-ТА-Mg и ТТСР. Причините да започнем именно с него са следните:

- Доказана висока цитосъвместимост при широк кръг миши и човешки клетъчни култури, включително МСК от адипозна тъкан, установена в индиректни и директни експерименти чрез методи с различни мишени (молекули, органели) и механизми на действие. За сравнение, експерименталните данни с ТТСР са с ограничен брой клетъчни култури;
- Стимулира пролиферацията на клетките от линия SAOS-2 и човешките МСК от адипозна тъкан, демонстрирано чрез имуноцитохимична техника за визуализиране на изявата на ядрения маркер за пролиферация Ki-67;
- Установена способност да поддържа адхезията и пролиферацията на клетките както на повърхността на материала, така и във вътрешността му;
- Не предизвиква цитоморфологични изменения в клетки от линия SAOS-2 и човешки МСК от адипозна тъкан и стимулира алкалната фосфатаза в тях;
- Достатъчно количество наличен материал за обезпечаване провеждането на разнообразни и продължителни експерименти;
- Удобен за работа – запазва формата и големината си (за сравнение АСР-ТА-Mg се „разтваря“ след няколкодневно култивиране, вероятно дължащо се на по-бързата биодеградация на този материал) в рамките на един месец (за такъв период са нашите наблюдения) и позволява осъществяване на продължителни експерименти.
- Удобен за стерилизация с достъпни методи и средства.

При провеждането на проучвания върху остеоиндуктивната способност на АСР-ТА, МСК бяха култивирани в:

- Конвенционална среда DMEM – Контрола;
- DMEM, инкубирана предварително за 3 и 6 часа в присъствие на АСР-ТА (DMEM-АСР-ТА);
- Диференцираща остеогенна среда (ДОС) на фирма Hi Media (Индия) ;
- Диференцираща остеогенна среда, инкубирана предварително за 3 и 6 часа в присъствие на АСР-ТА (ДОС-АСР-ТА).

Култивирането на МСК при описаните условия продължи 21 дена. Получените резултати показаха не само отлична преживяемост и пролиферативна активност на МСК клетките, но и успешно насочване на диференциацията им към остеоцити и остеобласти не само в присъствие на ДОС-АСР-ТА и ДОС, но и на DMEM-АСР-ТА. Доказателство за това са:

- Отлагането на калциеви кристали в екстрацелуларното пространство, наблюдавано след оцветяване с ализарин ред;
- Продукция на ензима алкална фосфатаза;

Липсата на токсичност, което показват повечето от тестираните от нас материали, в никакъв случай не може и не бива да се приема за еквивалент на биосъвместимост, но е една много важна крачка към комплексната оценка на биосъвместимостта на тези материали. За окончателното установяване на биосъвместимостта им е нужно провеждането на допълнителни изследвания с клетъчни култури и лабораторни животни, чрез които да се определи потенциалната им мутагенност, канцерогенност, влияние върху имунната система (включително способност да предизвикват реакции на свръхчувствителност), остра и хронична токсичност и др. Безспорно, най-голям интерес за нас представлява продължаването на вече започнатите експерименти с изолиране и култивиране на мезенхимни-стволови клетки и най-вече възможността те да бъдат използвани за нуждите на тъканното инженерство. Тъканното инженерство и регенеративната медицина днес далеч не са каприз и екзотика, а една от най-обещаващите стратегии в това отношение. Достатъчно е да споменем, че на всеки 54 секунди в света умира човек, който е можело да бъде спасен с тяхна помощ (Colombo et al., 2017).

VII. ИЗВОДИ

Получените от нас оригинални резултати ни позволиха да направим следните изводи.

1. С малки изключения (Zn-7, АСР-ТА-Na, АСР-LA) всички изпитвани от нас материали за костни заместители показват висока цитосъвместимост – клетъчната преживяемост / пролиферативна активност, установена в индиректни (при трите групи материали) и директни (при материалите от Група 3) експерименти е $\geq 70\%$ в сравнение с тази в контролата. Данните са получени чрез използване на широк кръг клетъчни модели (човешки, миши, плъши и говежди

постоянни клетъчни линии и първични култури) и методи с различни клетъчни мишени (молекули, органели) и механизми на действие. Прояви на генотоксичност (двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите) и цитопатологични изменения не бяха установени.

2. С увеличаване на началната гъстота на засяване на клетките се наблюдава повишаване на процента на живите клетки спрямо контролата. Тази зависимост най-вероятно се дължи на способността на клетките да секретират биологично активни вещества, стимулиращи, както собствената им пролиферация, така и тази на обкръжаващите ги клетки. Процентът на живите клетки спрямо контролата се повишава с удължаване на времето на култивиране, както и с увеличаване на количеството на материала.
3. Наблюдаван беше клетъчно-специфичен отговор - сравнително по-високата чувствителност на мишите и плъшите костномозъчни клетки към цитотоксичното действие на изпитваните материали може да се обясни поне отчасти с липсата или слабата експресия на т.нар. PGP – АТФ-зависима ефлукс помпа, която участва в изхвърлянето на ксенобиотиците от клетката.
4. АСП-ТА приложен за 21 дена под формата на конвенционална хранителна среда (DMEM с 10% ФТС) и диференцираща остеогенна среда (ДОС), инкубирани предварително в негово присъствие за 3 и 6 дена, не проявява цитотоксична активност и стимулира отлагането на калциеви кристали и продукцията на алкална фосфатаза в човешки мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан – доказателство за насочване към остеогенна диференциация на тези клетки.

VIII. ПРИНОСИ

Оригинални

1. При проведените от нас проучвания бяха получени оригинални данни за цитосъвместимостта на 21 нови материали за костни заместители, отнасящи се към групи с различни състав /структура, химични и физико-химични свойства. Чрез провеждане на директни експерименти и СЕМ анализ беше доказана способността на някои от тях (Материали от Група 3) да позволяват прилепването и пролиферацията на клетките на повърхността и във вътрешността им.

2. Установени бяха някои зависимости между състава / структурата на материалите и биологичната им активност, което ще улесни синтезирането на нови костни заместители с подобрени в желана от нас посока свойства.

3. Циментът АСР-ТА (аморфен калциев фосфат, модифициран с винена киселина) беше разпознат като нов цитосъвместим и остеоиндуктивен материал, способен да стимулира пролиферацията и остеогенната диференциация на човешки МСК от адипозна тъкан.

Приложни

1. Оптимизиран и въведен в лабораторната ни практика беше комплексен подход за оценка на цитосъвместимостта и остеоиндуктивността на калциево-фосфатни материали за костни заместители, включващ директни и индиректни експерименти, изпълнени чрез методи с различни мишени (клетъчни молекули и органели) и механизми на действие, както и широк набор от клетъчни моделни системи (човешки и животински, първични култури и постоянни клетъчни линии; туморни и нетуморни клетки; крайно диференцирани и стволови/прогениторни клетки).

Потвърдителни

1. Потвърдена е високата цитосъвместимост на калциевофосфатните материали, които отдавна са привлекли вниманието на специалистите като потенциални материали за костни заместители. Получените от нас нови данни в тази област ще подпомогнат идентифицирането на най-подходящите структури / форми на импланти за приложение в клиничната практика.

IX. SUMMARY

Bone damage repair is a multifaceted, coordinated physiological process that involves new bone formation and resorption, ultimately aimed at restoring broken bone to its original state. Various approaches are currently being applied to accelerate the recovery of bone defects, which include the use of 'gold standard'- autologous bone grafts. These grafts may not be readily available and procedural complications may lead to undesirable results (Kaushar Jahan et al., 2020). The search for new materials for bone regeneration is a challenge in biomedical research. For bone substitutes are used: Calcium phosphate materials based on hydroxyapatites with metals and amorphous calcium phosphate brushite cements; with metals and / or acids; as well as composite materials are used as bone substitutes. They have a number of properties that

give them advantages: (1) they are part of the mineral phase in the bone tissue; (2) bioactive, biodegradable and bioresorbable; (3) support bone healing. In the present dissertation an optimized design of in vitro studies is proposed to characterize the cyto- / bio-compatibility of new generation bone implant materials.

The aim of the PhD thesis presented was to investigate the cytocompatibility and osteoinductive activity of newly modified with metals [Mg (II) and / or Zn (II), Sr (II)] newly synthesized calcium phosphate materials for bone substitutes. The materials (a total number of 21) are divided into three groups: Group 1 - Powder samples of metal-modified [Mg²⁺ and / or Zn²⁺, Sr²⁺] calcium phosphate materials; Group 2 - Composite materials; Group 3 - Cements - Amorphous calcium phosphates with acids [tartaric, tartaric, lactic] and metals [Mg²⁺ + or Na¹⁺]. The experiments were performed with: non-tumor embryonic (Lep3, MRC-5) and newborn cell lines (BJ); embryonic mouse fibroblasts (BALB / c 3T3); healthy bovine kidney cells (MDBK); primary cultures from mouse and rat bone marrow; primary cultures and peralment cell line from mouse bone explants; Human tumor cells (MCF-7 breast cancer, cervical carcinoma HeLa, SAOS-2 osteosarcoma); human mesenchymal stem cells from adipose tissue.

The studies were carried out by methods with different cellular / molecular targets and mechanisms of action, such as: cytotoxicity assays (MTT / MTS test, neutral red uptake cytotoxicity assay, crystal violet staining, trypan blue staining); cell proliferation (immunocytochemistry for the detection of Ki-63), methods to study cell morphology / pathology and adhesion (hematoxylin and eosin staining, double staining with acridine orange and propidium iodide, light microscopy and SEM), genotoxicity assays (alkaline variant of Comet assay); methods to evaluate osteogenic activity (Alizarin red staining; evaluation of alkaline phosphatase) as well as statistical analysis.

The investigations were performed two groups of experiments: indirect experiments - the cells were cultured in calcium phosphate modified medium (CPM), in which the materials were pre-incubated for different periods of time (1 - 21 days) or in the presence of the materials themselves; direct experiments (in which the cells were seeded on the materials themselves) for a period of 1-6 days.

Our results revealed that: 1) With few exceptions (Zn-7, ACP-TA-Na, ACP-LA) all examined materials show high cytocompatibility - cell survival / proliferative activity found in indirect (for the three groups of materials) and direct (for the materials from Group III) experiments is $\geq 70\%$ compared to the control. Data were obtained using a wide range of cell

models (human, mouse, rat and bovine constant cell lines and primary cultures) and methods with different cell targets (molecules, organelles) and mechanisms of action. Manifestations of genotoxicity (double-stranded breaks in DNA molecules) and cytopathological changes were not detected. 2) With an increase in the initial seeding density of the cells, increase in the percentage of living cells compared to the control has been observed. This dependence is most likely due to the ability of cells to secrete biologically active substances that stimulate both their own proliferation and that of the surrounding cells. The percentage of live cells relative to the control increases with increasing time of culturing as well as with increasing amount of the material. 3) A cell-specific response is found - the relatively higher sensitivity of mouse and rat bone marrow cells to the cytotoxic action of the tested materials can be explained at least partially by the lack or low expression of the P-glycoprotein - ATP-dependent efflux pump, which is involved in the expulsion of xenobiotics from the cell. 4) ACP-TA administered for 21 days in the form of a conventional culture medium and differentiating osteogenic medium, pre-incubated in its presence for 3 and 6 days, shows no cytotoxic activity and stimulates the deposition of calcium crystals and production of alkaline phosphatase in human mesenchymal stem adipose tissue cells - evidence of targeting osteogenic differentiation of these cells.

X. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Ванков, В., Г. Гълъбов. *Анатомия на човека. Медицина и физкултура*, София, 1990.
2. Adrogué H. , Madias N. Diagnosis and treatment of hyponatremia, *Am J Kidney Dis*; 2014 64(5):681-4. doi: 10.1053/j.ajkd.2014.06.001
3. Alexandrova, R., Andonova-Lilova B., Abudalleh A., Zhivkova T. , Dyakova L., Alexandrov O., Saha N. Brief overview of new materials for bone implants. *Proceedings of the Tenth Workshop on Biological Activity of Metals, Metal Compounds and Natural Products*, 2015, 103- 109.
4. Alexandrova, R. Multidrug resistance and P-glycoprotein. Minireview. *Experimental Pathology and Parasitology*, 1, 1998, 62-66.
5. Alexandrova, R., E. Nikolova. Matrix metaloproteinases and cancer. *Exp. Pathol. Parasitol.*, 5/8, 2002, 25-34.
6. Alexandrova, R., G. Rashkova, D. Salkova, I. Sainova. Something more about zinc. *Exp. Pathol. Parasitol.*, 2002, 5/8, 17-24.

7. Alexandrova, Radostina, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Boyka Andonova-Lilova, Desislav Dinev, Abedulkadir Abudalleh, Nabanita Saha, Virginija Jankauskaitė, Orlin Alexandrov. Briefly about Mesenchymal Stem Cells - One of the Main Players in Bone Tissue Engineering. *Adv Cytol Pathol.* 2018;3(1):15–18. DOI: 10.15406/acp.2018.03.00045
8. Bandyopadhyay A., E.A. Withey, J. Moore, S. Bose, Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants *Mater. Sci.Eng. C*, 2007 27, 14
9. Ciuffi S, Zonefrati R, Brandi ML Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2017, 14(2):217-226.
10. Colombo F., Gianluca Sampogna, Giovanni Cocozza, Salman Yousuf Guraya, Antonello Forgione Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives, *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 5 (2017) 1–8
11. Dahl JA, Duggal S, Coulston N, et al. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. *The International Journal of Developmental Biology*, 2008, 52:1033–1042.
12. David F. Williams, *Biomaterials*, Volume 29, Issue 20, July 2008, pages 2,941–2,953; D Williams, *Medical Device Technology* 14(8) October 2003
13. Debnatha T., Lakshmi Kiran Chelluri Standardization and quality assessment for clinical grade mesenchymal stem cells from human adipose tissue 2018 *Hematology Transfusion and Cell Therapy* 41(1) DOI: [10.1016/j.htct.2018.05.001](https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.05.001)
14. Dickens B., L.W. Schroeder, W.E. Brown, J. Sol. *Stat. Chem.* 10, 232 (1974)
15. Dorland's Medical Dictionary, <http://www.dorlands.com/wsearch.jsp?letter=B&range=i-m&start=151&end=200>)
16. Follmar K, Decroos F, Prichard H, Wang H, et al. (2006) Effects of glutamine, glucose, and oxygen concentration on the metabolism and proliferation of rabbit adipose-derived stem cells. *Tissue Eng* 12:3525–3533
17. Fujii E., M. Ohkubo, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, K. Kawabata, C. Bonhomme, F. Babonneau, Selective protein adsorption property and characterization of zinc-containing hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia*. 2, 69-74 (2006)
18. Hashizume M., M. Yamaguchi, Stimulatory effect of β -alanyl-L-histidinato zinc on cell proliferation is dependent on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells *Mol. Cell. Biochem.* 122:59, 1993

19. Head C, Gardiner Paroxysms of excitement: sodium channel dysfunction in heart and brain, *BioEssays*, Volume 25, Issue 10, 2003, 981-993
20. Hu L., Juan Wang , Xin Zhou, Zehuan Xiong, Jiajia Zhao, Ran Yu, Fang Huang, Handong Zhang, Lili Chen Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts, *Scientific Reports*, volume 6, Article number: 32993 (2016)
21. Hyun T.H., E. Barrett-Connor, D.B. Milne, Zinc intakes and plasma concentrations in men with osteoporosis: the Rancho Bernardo Study, *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 715 (2004) ISBN-10: 1617312770
22. Ito A., H. Kawamura, S. Miyakawa, P. Layrolle, N. Kanzaki, G.Treboux, K. Onuma, S.T. Sutsumi, Resorbability and solubility of zinc-containing tricalcium phosphate, *J. Biomed. Mater. Res.* 60:224, 2002
23. Ivelin Vladov M. Gabrashanska, M. Alexandrov, V. Nanev, P. Dimitrov, S. Tepavitcharova, R. Ilieva In Vivo Behaviour of Calcium Phosphate Composites The Seventh Workshop “Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products”, 27-29 November 2012, Sofia Bulgaria
24. Jahan K., Garthiga Manickam, Maryam Tabrizian, Monzur Murshed In vitro and in vivo investigation of osteogenic properties of self-contained phosphate-releasing injectable purine-crosslinked chitosan-hydroxyapatite constructs *Scientific Reports* volume 10, Article number: 11603 (2020).
25. Julian L. M. and Stanford W. L., Organelle Cooperation in Stem Cell Fate: Lysosomes as Emerging Regulators of Cell Identity, *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 591. doi: 10.3389/fcell.2020.00591
26. Kawamura H, Ito A, Miyakawa S, Layrolle P, Ojima K, Ichinose N, Tateishi T, Stimulatory effect of zinc-releasing calcium phosphate implant on bone formation in rabbit femora, *J. Biomed. Mater. Res.* 50:184, 2000
27. Kawamura H., A. Ito, T. Muramatsu, S. Miyakawa, N. Ochiai, T. Tateishi, Long-term implantation of zinc-releasing calcium phosphate ceramics in rabbit femora, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 65:468 (2003)
28. Kishi S., M. Yamaguchi, *Biochem. Pharmacol.* Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures, 48, 1225, 1994

29. Lin F.H., C.H. Liao, K.S. Chen, J.S. Sun, C.P. Lin, Petal-like apatite formed on the surface of tricalcium phosphate ceramic after soaking in distilled water, *Biomaterials* 22:2981, 2001
30. Meza-Zepeda LA, Noer A, Dahl JA, et al. (2008) Highresolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12:553–563.
31. Moonga B.S., D.W. Dempster, Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro *J. Bone Miner. Res.*10:453, 1995
32. Olson T.M , Virginia V Michels, Jeffrey D Ballew, Sandra P Reyna, Margaret L Karst, Kathleen J Herron, Steven C Horton, Richard J Rodeheffer, Jeffrey L Anderson, Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation, 2005, *JAMA*, 26;293(4):447-54, doi: 10.1001/jama.293.4.447.
33. Otsuka M., Y. Ohshita, S. Marunaka, Y. Matsuda, A. Ito, N.Ichinose, K. Otsuka, W.I. Higuchi, Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 9, 552, 2004
34. Percival SL, J.T. Walker, Potable water and biofilms: A review of the public health implications, *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*,vol.14, 2, 1999
35. Petar Dimitrov, Ivelin Vladov, Veselin Nanev, Radost Ilieva, Diana rabadjieva, Kostadinka Sezanova, Rumyana Gergulova, Stefka Tepavicharova, Margarita Gabrashanska, Marin Alexandrov, Calcium phosphate composites and their behaviour in a rat model Conference: Scientific Conference with International Participation „Tradition and Modernity in Veterinary Medicine”2012;
36. Professor David Williams, *The Williams Dictionary of Biomaterials*, 1999, p.40
37. Saidak Z., Caroline Marty, Alain Barbara, Pierre J. Marie, Strontium ranelate rebalances bone marrow adipogenesis and osteoblastogenesis in senescent osteopenic mice through NFATc/Maf and Wnt signaling, *Aging cell* 2012, vol/11, 3, 467-474
38. Scarcello E, Dominique Lison, Are Fe-Based Stenting Materials Biocompatible? A Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Studies, 2019, *J Funct Biomater*, 21;11(1):2, doi: 10.3390/jfb11010002
39. Schroeder L.W., B. Dickens, W.E. Brown, *Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with zn and mg based dopants* *J. Sol. Stat. Chem.* 22:253 (1977)
40. Sidney I. Landau; E. Lovell Becker; Alexandre Manuila, *International Dictionary of Medicine and Biology*

41. Smiljanec K., Lennon S., Sodium, hypertension, and the gut: does the gut microbiota go salty?, 2019, Am J Physiol Heart Circ Physiol., 317(6):H1173-H1182, doi: 10.1152/ajpheart.00312.2019.
42. Sogo Y., A. Ito, K. Fukasawa, T. Sakurai, N. Ichinose, Mater. Sci.Tech. 20, 1079 (2004)
43. Storrie H., S.I. Cellular response to zinc-containing organoapatite: an in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization, Stupp, Biomaterials 26, 5492 (2005)
44. Tardei C., F. Grigore, I. Pasuk, S. Stoleriu, The study of Mg^{2+}/Ca^{2+} substitution of β -tricalcium Phosphate, J. Optoelectr. Adv.Mater. 8, 568 (2006)
45. Tas A., S.B. Bhaduri, S. Jalota, Preparation of Zn-doped β -tricalcium phosphate (β - $Ca_3(PO_4)_2$) bioceramics, Mater. Sci. Eng. C 27, 394 (2007)
46. Yoshida K., N. Kondo, H. Kita, Effect of Substitutional Monovalent and Divalent Metal Ions on Mechanical Properties of β -Tricalcium Phosphate, J. Am. Ceram. Soc. 88, 2315(2005)

XI. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

СТАТИЯ В СПИСАНИЕ С ISI ИМПАКТ ФАКТОР

1. **ANDONOVA-LILOVA B.**, Alexandrova R., Rabadjieva D., Tepavitcharova S. Application of cultured murine cells for initial evaluation of the biocompatibility of Mg and Zn-modified tricalcium phosphates. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 65 (8), 2012, 1099-1104, ISSN 1310-1331, IF 0.210.

СТАТИЯ В МЕЖДУНАРОДНО СПИСАНИЕ БЕЗ ISI ИМПАКТ ФАКТОР.

2. **ANDONOVA-LILOVA B.**, Zhivkova T., Dyakova L., Rabadjieva D., Tepavitcharova S., Alexandrova R. Mg-modified calcium phosphate – a promising material for bone implants. Trakya J. Sci., 4, 2013, 321-324, ISSN 1313-7050 - print; 1313-3551 – online [http://tru.unis-
sz.bg/tsj/N4,%20Vol.11,2013/B.Andonova.pdf](http://tru.unisz.bg/tsj/N4,%20Vol.11,2013/B.Andonova.pdf)
3. Sezanova, K., S. Tepavitcharova, D. Rabadjieva, R. Gergulova, **B. ANDONOVA-LILOVA**, R. Alexandrova. In vitro behavior of composite materials based on Zn-modified calcium phosphate powders. Materials, Methods, Technologies, 2015, 9, 386-394. (ISSN: 1314 – 7269).

4. **Alexandrova R., Abudalleh A., Zhivkova T., Dyakova L., ANDONOVA-LILOVA B.**, Alexandrov O., Saha N. Briefly about bone defects and new strategies to treat them: Review. Acta morphologica et anthropologica, 22, 2015, 142-149. ISSN:0861-0509
5. Ilieva R., Gergulova R., Tepavitcharova S., Sezanova K., Apostolov A., **ANDONOVA-LILOVA B.**, **Alexandrova R.** Preparation And characterization of brushite cements based on amorphous calcium phosphate and carboxylic acids. Materials, Methods & Technologies, 11, 2017, pp: 188-197 ISSN:1314-7269,
6. Alexandrova, Radostina, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, **BOYKA ANDONOVA-LILOVA**, Desislav Dinev, Abedulkadir Abudalleh, Nabanita Saha, Virginija Jankauskaitė, Orlin Alexandrov. Briefly about Mesenchymal Stem Cells - One of the Main Players in Bone Tissue Engineering. Adv Cytol Pathol. 2018;3(1):15–18. DOI: 10.15406/acp.2018.03.00045
7. **ANDONOVA-LILOVA, B.**, T. Zhivkova, L. Dyakova, A. Abudalleh, D. Rabadzieva, S. Tepavitcharova, N. Saha, V. Jankauskaitė, R. Alexandrova Experimental Approach as Research Strategy for Cytocompatibility Assessment of New Materials for Bone Implants. Acta Morphologica et Anthropologica. 2018, 15(3-4), p. 17-21. ISSN 0861-0509
8. **ANDONOVA-LILOVA, B.**, R. Alexandrova, K. Sezanova, R. Gergulova, D. Rabadjieva. In Vitro Behavior of Zn-Modified Calcium Phosphate Fine Powders. International Journal of Advances in Science Engineering and Technology, 7(1), 2019, ISSN(p): 2321 –8991, ISSN(e): 2321 – 9009.

ПУБЛИКАЦИИ НА ДОКЛАД В ПЪЛЕН ТЕКСТ В МАТЕРИАЛИ ОТ ЧУЖДЕСТРАННО НАУЧНО МЕРОПРИЯТИЕ ИЛИ В МАТЕРИАЛИТЕ НА МЕЖДУНАРОДНО НАУЧНО МЕРОПРИЯТИЕ У НАС

9. Alexandrova, R., T. Jivkova, L. Dyakova, **B. ANDONOVA-LILOVA**, O. Alexandrov, R. Kalfin, S. Tepavicharova. Biomaterials, bone implants, new technologies. The Fourth Symposium with International Participation. New trends and strategies in the chemistry of advanced materials. 4-5 November, 2010, Timisoara, Romania, p.14-19. (ISSN 2065 – 0760).
10. **BOYKA ANDONOVA-LILOVA**, Lora Diakova, Radostina Alexandrova, Diana Rabadjieva, Stefka Tepavitcharova. Effects of ion modified calcium phosphates on viability and proliferation of human cancer cells, The Fifth Symposium with International Participation. New trends and strategies in the chemistry of advanced materials., 2011, Timisoara, Romania, p. 23-26. (ISSN 2065 – 0760).
11. **ANDONOVA-LILOVA B.**, Zhivkova T., Dyakova L., Rabadjieva D., Tepavitcharova S., Alexandrova R. Viability and proliferation of rat bone marrow cells cultured in the presence of newly synthesized composite materials for bone implants. The Sixth Edition of the Symposium

with International Participation “New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials”- 8-9 November 2012, Timisoara, Romania, p.7-10 (ISSN: 2065 - 0760)

12. Gergulova R., S. Tepavitcharova, D. Rabadjieva, K. Sezanova, R. Ilieva, R. Alexandrova, **B. ANDONOVA-LILOVA**. Biomimetic synthesis of modified calcium phosphate fine powders and their in vitro studies. AIP Conference Proceedings 1569, 194(2103), 2013, 194-198.

ПУБЛИКАЦИИ НА ДОКЛАД В ПЪЛЕН ТЕКСТ В МАТЕРИАЛИ ОТ БЪЛГАРСКО НАУЧНО МЕРОПРИЯТИЕ

13. Radostina Alexandrova, **BOYKA ANDONOVA-LILOVA**, Abdulkadir Abudalleh, Tanya Zhivkova, Pavel Mitrenga, Lora Dyakova, Orlin Alexandrov. Bone tissue engineering. The Ninth Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, November 26-28, 2014, Sofia, Bulgaria, p. 126-131. ISSN 2367-5683.
14. Radostina Alexandrova, **BOYKA ANDONOVALILOVA**, Abedulkadie Abudalleh, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Orlin Alexandroov, Nabanita Saha, Olafur Sirurjonsson. BRIEF OVERVIEW OF NEW MATERIALS FOR BONE IMPLANTS. The Xth Workshop on Biological Activity of Metals and Metal Compounds, 17-19 November, 2015, Sofia, Bulgaria, p. 103-109. ISSN 2367-5683.

XII. НАГРАДИ

I награда на публиката за най-добра презентация във II Докторански симпозиум „Молекулярна биология - Нови Хоризонти“ 6-7 април 2017, София

I^{ва} Награда For the Outstanding Poster in Topic „Morphology, Ecology, livestock Breeding”: Animal and Human Cell Cultures as Model Systems For Cytocompatibility Assessment of New Materials for Bone Implants, International Scientific Conference "Tradition and Modernity in Veterinary Medicine", 12-14 April, 2019, Yundola, Bulgaria

XIII. БЛАГОДАРНОСТИ КЪМ НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

1. Договор №ДТК 02 – 70/2009 г., финансиран от Фонд „Научни изследвания” при МОМН на тема: «Биоматериали за костни импланти-калциево-фосфатни базирани керамики, цименти и хибридни материали». (Координатор на проекта –

доцент д-р Стефка Тепавичарова, И-т по обща и неорганична химия, БАН).
Ръководител на Работна група от ИЕМПАМ-БАН – гл. ас. Радостина
Александрова, доктор.

2. Договор №ДФНИ Т 02-15 от 12.12.2014 г., финансиран от Фонд „Научни изследвания” при МОН, на тема: „Изследване на връзката синтез-структура-фазовогранични преходи-механични свойства-биологични свойства при композитни калциево-фосфатни биоматериали с приложение в костната хирургия и денталната медицина“. Ръководител на проекта – доц. Диана Рабаджиева, доктор, Институт по обща неорганична химия – БАН. Ръководител на Работна група от ИЕМПАМ-БАН – доц. Радостина Александрова, доктор.
3. Договор № ДФНИ Б-02/30 от 12.12.2014 г. на тема: „Експериментални моделни системи за проучвания в областта на злокачествените новообразувания и костното моделиране“. Ръководител на проекта – доц. Радостина Александрова, доктор.
4. Проект № BG051PO001-3.3.06-0048 на тема: „Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи за ефективно прилагане на биомедицинските изследвания за подобряване качеството на живот” с ръководител проф. дбн Нина Атанасова. Проектът е финансиран по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз.
5. Проект № BG051PO001-3.3.06 - 0048/04.10.2012 г., финансиран в рамките на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз, по схема за безвъзмездна финансова помощ «Подкрепа за развитието на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени» (2012-2014);
6. COST Акция MP1301 “New Generation Biomimetic and Customized Implants for Bone Tissue Engineering” (2013 – 2017); Доц. Р. Александрова е член на Управителния съвет и ръководител на група от България.
7. Договор между ИЕМПАМ-БАН и Литовската академия на науките – Kaunas University of Technology, Литва, на тема: „Bone Tissue Engineering: in vitro Biocompatibility Assessment of New Materials For Bone Implants”, Срок на изпълнение: 2016 – 2018 г. Ръководител от българска страна: доц. Радостина Александрова, доктор.

