

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
Институт по Биофизика и Биомедицинско инженерство

**Камелия Тодорова Христова**

**Модулирано взаимодействие на остеобласти с хидроксиапатитни  
материали**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**На дисертация за присъждане на образователна и научна степен  
“Доктор”**

**Научен ръководител:**  
**Проф. д-р Георги Алтънков, дбн**

София 2011

Дисертацията обхваща 111 страници, съдържа 23 фигури и 2 таблици. Библиографската справка включва 162 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден на разширен семинар на секция “Електроиндуцирани и адхезивни свойства” при Институт по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН на 26.07.2011 г. и е насочена за защита пред специализирано научно жури.

Защитата на дисертационния труд се състои на.....2011г. от ..... часа в залата на Института по физиология на растенията и генетика – БАН, София 1113, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл.21, ет 2, на рзширен семинар на секция “Електроиндуцирани и адхезивни свойства” при Институт по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН пред специализирано научно жури.

Материалите по защитата са на разположение на заинтересуваните в канцеларията на Институт по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН.

## Увод

Механичната здравина и твърдост на костната тъкан и опорната функция, която изпълнява, често създават погрешна представа за инертна структура с определено статични характеристики. По-задълбоченото вникване във физиологията на костта обаче дава коренно различна представа - а именно, че костната тъкан е силно динамична многофункционална система, обединяваща химично, клетъчно, метаболитно и архитектурно разнообразие, което на микроноиво е свързано с координираното протичане на множество процеси и с прецизното взаимодействие на костните клетки помежду им и с компонентите на екстрацелуларния матрикс. Добрата морфологична адаптивност, комбинирана с механична устойчивост и забележителният регенерационен потенциал на костната тъкан са истинско предизвикателство за регенеративната медицина, както и за печелещото все по-голяма популярност тъканно инженерство.

Въпреки забележителните постижения през последните години медицинската наука все още търси подходящия материал, който да замести или подсили костната тъкан чрез костна трансплантация. Лечението на множество заболявания като фрактури при тежки травми, масивни дефекти при туморна резекция, псевдоартрози, широки остеомиелитни огнища и т.н., налага използването на хирургична интервенция, изискваща наличието на подходящ присадъчен материал, който да провокира регенерацията на увредената тъкан. От дълго време като „златен стандарт” в тази област се е наложило автоложното костно заместване, което за съжаление не винаги е възможно поради ограничения ресурс от собствена костна тъкан. От друга страна, използването на алогенни трансплантанти създава предпоставки за развитие на имунна реакция. Ето защо, напоследък биоинженерната наука насочи усилията си към разработването на изкуствени материали, максимално приближаващи се химически, структурно и функционално до нативното костно вещество. Това стана възможно благодарение развитието на тъканното инженерство, обединяващо познанията на материалознанието, биологията и инженерните науки. Въведе се понятието биосъвместимост, но не в смисъла на биологична инертност, а като търсен ефект на интеграция с естествената тъкан, като взаимодействие, осигуряващо необходимите условия за пускането в ход на собствените възстановителни механизми. Сега вече се търси позитивният отговор към „чуждото тяло” и оптимизирането на този отговор в полза на пълното тъканно възстановяване.

От няколко години в Института по Биофизика и биомедицинско инженерство на БАН се провеждат системни изследвания върху взаимодействието на клетки с биоматериални повърхности *in vitro*, като в тази насока е установено ползотворно сътрудничество с различни лаборатории у нас и в чужбина. Една от тези тематики, разработвана съвместно с Техническият Университет в Барселона (Biomedical Engineering Division), е свързана именно със създаването и биологичното характеризирание на един сравнително нов тип материал, предназначен за възстановяване на костната тъкан, а именно - хидроксиапатитният (ХА) цимент, известен още като

Биоцимент. Настоящият дисертационен труд включва част от това изследване и се простира главно върху биологичното характеризирание на биоцимента, както и върху опитите за модификация на неговата биологична съвместимост чрез физическа адсорбция или добавяне към циментовата смес на белтъци от екстрацелуларния матрикс, в това число фибронектин, серумни фактори и колаген.

В процеса на търсене на нови биоматериални повърхности за целите на тъканното инженерство бяха формулирани и целите на настоящата работа:

### Цел

Целта на настоящата работа е да се изследва биосъвместимостта и физикохимичните качества на различни типове хидроксиапатитни покрития и цименти, предназначени за заместване на костна тъкан и да се потърсят начини за тяхното подобряване.

### Задачи

1. Изследване на физикохимични характеристики на различни нормални и колаген-композитни  $\alpha$ -ТСР цименти
  - Измерване времената на кохезия и втвърдяване. Отчитане влиянието на колагена
  - Изследване повърхностната морфология на циментите. Отчитане влиянието на колагена
2. Нано-структурно модифициране повърхността на нормални и композитни цименти, чрез послойно (Layer-by-Layer) отлагане на полиелектролити
  - Изграждане на многослойни полиелектролитни нано-покрития на базата на хепарин и хитозан
  - Включване на матриксни белтъци в полиелектролитните слоеве
3. Биологично характеризирание на обемно- и повърхностно модифицираните цименти – инициално взаимодействие с остеобласти и мезенхимни стволови клетки
  - Морфологична оценка на адхезираните остеобласти от линията MG-63 към  $\alpha$ -ТСР циментите
  - Количествена оценка на клетъчната адхезия
  - Роля на преадсорбцията с адхезивни протеини (Фн)
  - Отчитане влиянието на колагена
  - Отчитане влиянието на многослойните наноструктурни покриващи слоеве
4. Биологично характеризирание на хидроксиапатитни покрития – влияние на включването на нанодиамаанти
  - Изследване адсорбцията на Фн
  - Морфологична оценка на инициалната клетъчна адхезия при остеобластната линия MG 63
  - Количествена оценка на клетъчната адхезия и развитието на фокални адхезионни контакти
  - Роля на преадсорбцията с адхезивни протеини (фибронектин, витронектин и серум)

- Изследване организацията на провизорен фибронектинов матрикс

## Методи

За реализация на поставените задачи бяха използвани следните съвременни биофизични, биохимични и цитологични методи и подходи:

1. Подготовка на образци от  $\alpha$  – трикалциево фосфатен цимент ( $\alpha$ -TCP)
2. Отливане на  $\alpha$ -TCP цимент и композити колаген/ $\alpha$ -TCP цимент във формата на таблетки
3. Измерване на кохезионното време и времето на втвърдяване
4. Получаване на ХА-НД покрития
5. Многослойно отлагане на полиелектролити по “Layer by layer” метода
6. Клетъчно култивиране на остеобласти и Мезенхимни стволови клетки от плъши костъен мозък и
7. Получаване на колаген от плъши опашки
8. Получаване на FITC-маркиран Фибронектин
9. Клетъчна адхезия и обща клетъчна морфология
10. Витално оцветяване с флуоресцеин-диацетат (FDA)
11. Количествено определяне на клетъчната адхезия по метода на “случайните полета”

## Резултати

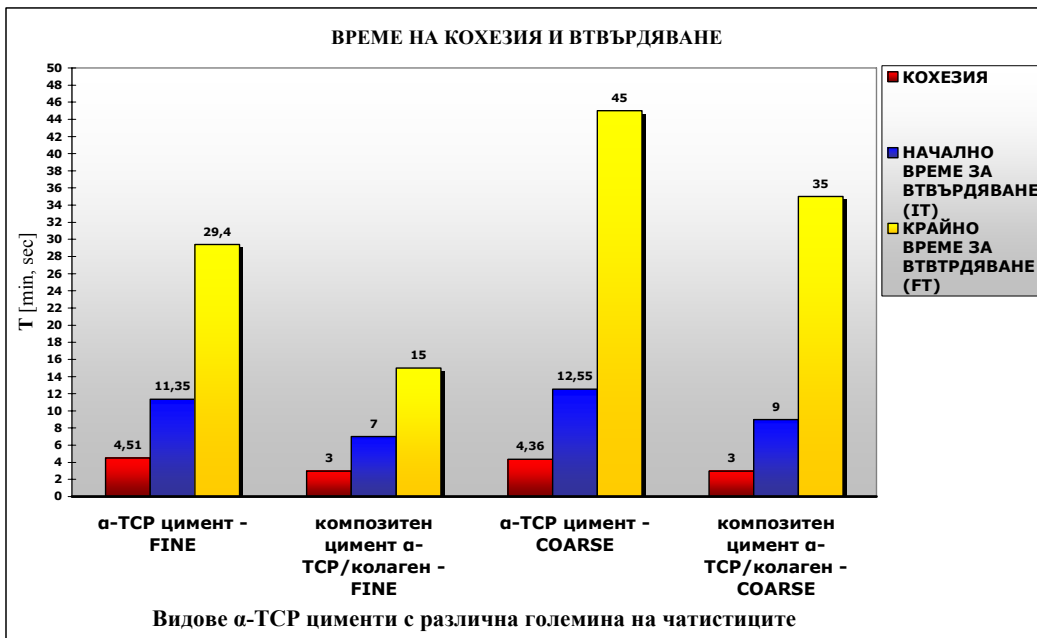
### 1. Подготовка и физико-химично характеризирание на чисти и композитни цименти

#### 1.1. Измерване на времената на кохезия и втвърдяване на различните видове $\alpha$ -TCP – цименти

Резултатите от измерването на времената на кохезия, начално и крайно втвърдяване на пробите са обобщени и онагледени във фигура 1.1.

Получените резултати показват леко предимство на FINE  $\alpha$ -TCP - цимента пред COARSE  $\alpha$ -TCP - цимента по отношение запазването интегративността на материала. Добавянето на колаген към циментите понижава стойностите на кохезионното време, както при FINE- така и при COARSE-цимента. Това показва най-общо, че композитните цименти са по-салбо кохезивни, т.е. лепливи, което следва да се вземе под внимание при евентуалното им приложение в медицината.

От друга страна, началното време на втвърдяване (IT) на FINE  $\alpha$ -TCP – цимента е по-малко от това на COARSE  $\alpha$ -TCP – цимента, като тази тенденция се запазва и за крайното втвърдяване (FT). Това следва да обясним с по-голямата обща повърхност и по-бързото (ре)кристализиране на хидроксиапатита.

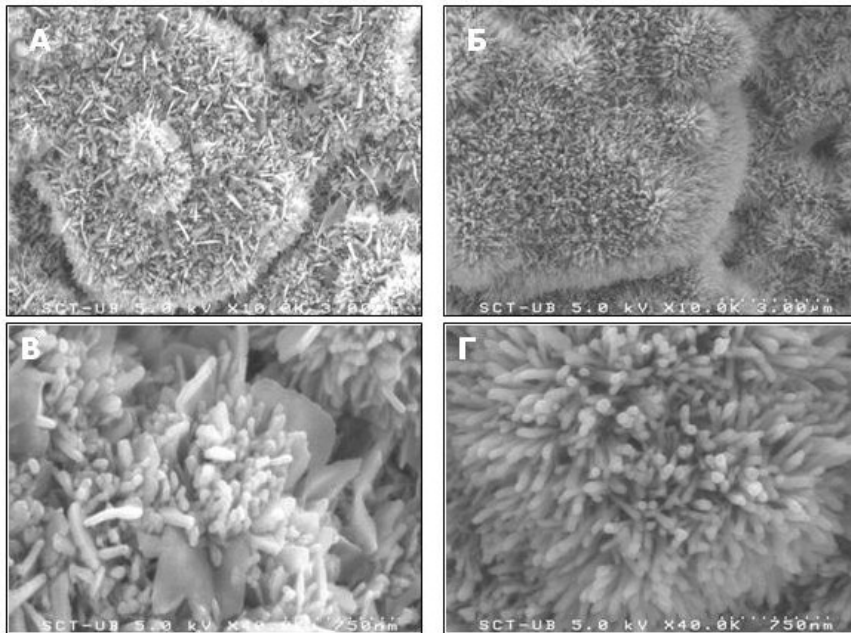


**Фигура 1.1** - Времена на кохезия и втвърдяване на различните видове цименти

И двата композитни материала показват занижени стойности на времената на втвърдяване (и начални, и крайни). Следователно, присъствието на колаген в течната субстанция при приготвянето на циментите предизвиква ускорено образуване на хидроксиапатитните кристали и по-бързо достигане на крайна твърдост. Особено отчетливо е това влияние на колагена при FINE-композитния цимент, при който крайното време (FT) се редуцира наполовина в сравнение с чистата форма. На този етап е трудно да се обясни какъв е механизма на този ефект, но съществуват литературни данни, че хидроксиапатитът притежава свойството да изкристализира вътре, в молекулата на колагена [95]. Появата на такива нано-кристали вече може да служи като ядро за последващата микрокристализация. Това косвено се потвърждава и от морфологичните наблюдения, описани по-долу в текста.

## 1.2. Характеризиране повърхността на различните видове $\alpha$ -TCP – цименти и отчитане влиянието на колагена - СЕМ изследвания

Това изследване беше направено, за да получим по-голяма яснота относно повърхността на циментите и това как добавянето на колаген влияе върху тази характеристика. От предишни изследвания на нашите партньори [28] се знаеше, че по-малките частици на FINE-цимента провокират образуването на по-дребни и по-гъсто разположени хидроксиапатитни кристали при хидратацията на  $\alpha$ -TCP в сравнение с COARSE-цимента. Действително, нашите електронно-микроскопски снимки потвърдиха този факт, но, както уточнихме по-горе, за нас беше интересно влиянието на колагена върху повърхностната морфология на пробите.



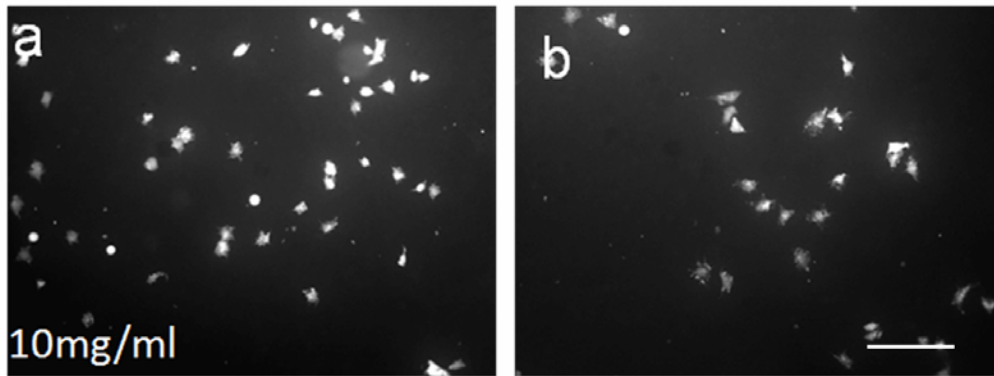
**Фигура 1.2** Сканираща електронна микроскопия на повърхността на  $\alpha$ -ТСП цимент – FINE (А, В) и композитен цимент  $\alpha$ -ТСП/ колаген – FINE (Б, Г). Увеличение 10 000 x (А, Б) и 40 000 x (В, Г).

Както се вижда на фигура 1.2, при колагеновите композити хидроксиапатитните кристали са по-равномерно разпределени и по-гъсти в сравнение с безколагеновите си аналози. Този ефект е много ясно изразен при FINE- $\alpha$ -ТСП циментите и се вижда добре при по-голямо увеличение на сканиращия електронен микроскоп - фигура 1.2 – в и г. Причината следва да се търси отново в предхождащата вътремолекулярна нанокристализация. Този процес остава невидим за нашия метод, но е логично ефектът да се проявява по-добре при по-голямата относителна повърхност на FINE- циментите, позволяваща по-голяма контактна площ за хидратацията на калциево-фосфатните частички.

## **2 Биологично характеризирание на различните видове $\alpha$ -ТСП – цименти. Отчитане ефекта на повърхностно и обемно модофициране с колаген**

### **Инициална адхезия на MG-63 клетки**

За подробното характеризирание на биосъвместимостта на тези нови биоматериали беше проучена инициалната адхезия на MG-63 клетки върху непокрити композитни цименти и Фн покрити чисти проби от  $\alpha$  ТСП след *in vitro* инкубация от 2 часа. Бяха проведени предварителни експерименти с цел да се уточни оптималната концентрация на колагена в композитните проби. За такава беше приета 10мг/мл при съотношение течна към твърда маса 0.8. Общата морфология на клетките върху непокритите композити и покритите проби е представена на фиг.2.1.

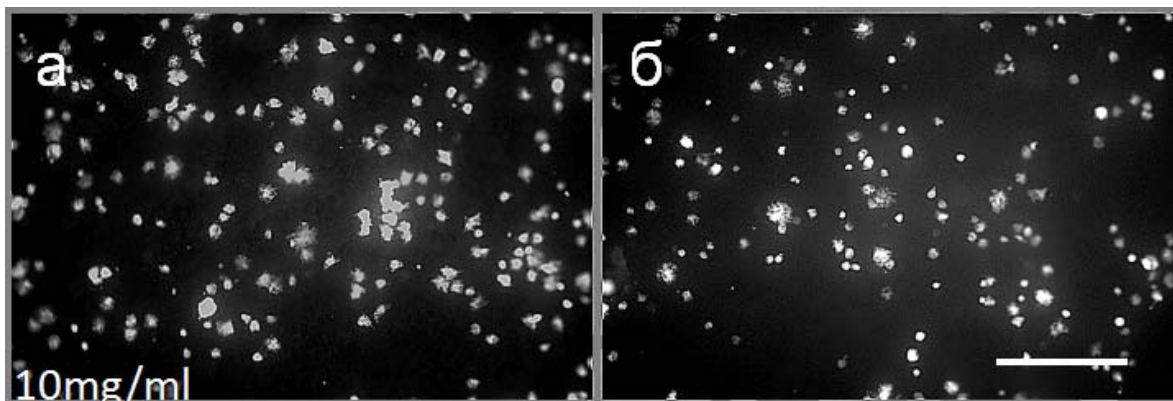


**Фиг. 2.1.:** Обща морфология на клетки от клетъчна линия MG 63 след 2 часа адхезия върху композитен цимент (а) с 10mg/ml концентрация на колагена и върху Фн покрити  $\alpha$ -ТСП (б). Бар 100 $\mu$ m.

От фигурата добре се вижда, че клетките се прикрепят малко по-добре върху композитният материал, но не са достатъчно разстлани, докато върху Фн-покритите проби имат предимно поляризирана форма. Количествените резултати за клетъчната адхезия показват значително увеличение (около 30 %) на броя на клетките върху композитният цимент (фиг.2.1.-а)

### Инициална адхезия на стволови клетки

Съществуват различни клетъчни модели, които се използват за експериментално тестване на свойствата и приложимостта на биоматериалите. Най-общо използвани са нетрансформирани или трансформирани остеообласти от различни организми, както и стволови клетки с потенциал да се диференцират в остеообласти. В нашите експерименти, освен човешката остеосаркомна линия (MG-63) ние използвахме и плъши мезенхимни стволови клетки от костен мозък. Първата клетъчна линия е модел на полу-диференцирани остеообласти, а втората – на клетки с потенциал да се диференцират в такива. Използването на мезенхимни стволови клетки е главен фокус на регенеративната медицина за костна тъкан, което ни подтикна да изследваме взаимодействието им с новият биоамтериал. Морфологията на мезенхимните стволови клетки върху непокритите композити и покритите проби е представена на фиг.2.2.



**Фиг.2.2:** Обща морфология на мезенхимни стволови клетки от костен мозък на плъх след 2 часа адхезия на композитен цимент (а) с 10mg/ml концентрация на колагена и върху Фн покрити  $\alpha$ -ТСП; бар - 100 $\mu$ m.



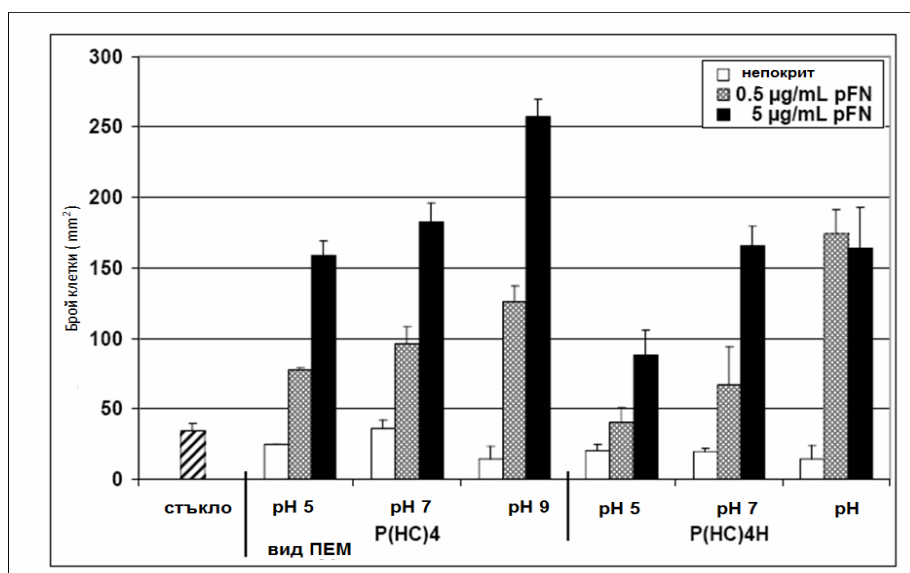
Мезенхимните стволови клетки, подобно на клетките от клетъчна линия MG 63, се прикрепят по-добре към композитният материал в сравнение с Фн покритите проби. При тях, обаче се наблюдава и по-добро разстилане върху колаген-цимент композита. По-продължителни изследвания, обаче показваха, че взаимодействието на мезенхимните стволови клетки с  $\alpha$ -ТСР, независимо от това дали са композитни или не, е лошо. Още на 24 часа след инкубацията върху изследваните материали се наблюдава значително намаление на броя на клетките (резултатите не са показани).

### 3 Биологично характеризирани на $\alpha$ -ТСР цименти модифицирани с мултислоеве

#### 3.1 Взаимодействие на човешки остеобласти с мултислоеве, отложени върху стъкло като моделен субстрат

Целта на това изследване беше да се провери дали модифицирането на материали с отлагане на мултислоеве може да подобри взаимодействието с остеобласти. Конкретно, проверихме как промяната в стойностите на рН по време на формирането на слоевете и вида на терминалния слой повлияват клетъчната адхезия и спрединг, и от друга страна, каква е ролята на фибронектина - един от основните ЕЦМ-белтъци на кръвта и биологичните течности.

Първо, мултислоеве с хитозан (средните три групи от колони) и хепарин (десните три групи колони) като терминален слой, покрити или не с плазмен Фибронектин (пФн) бяха изследвани по отношение на адхезията на клетки от клетъчна линия MG-63.



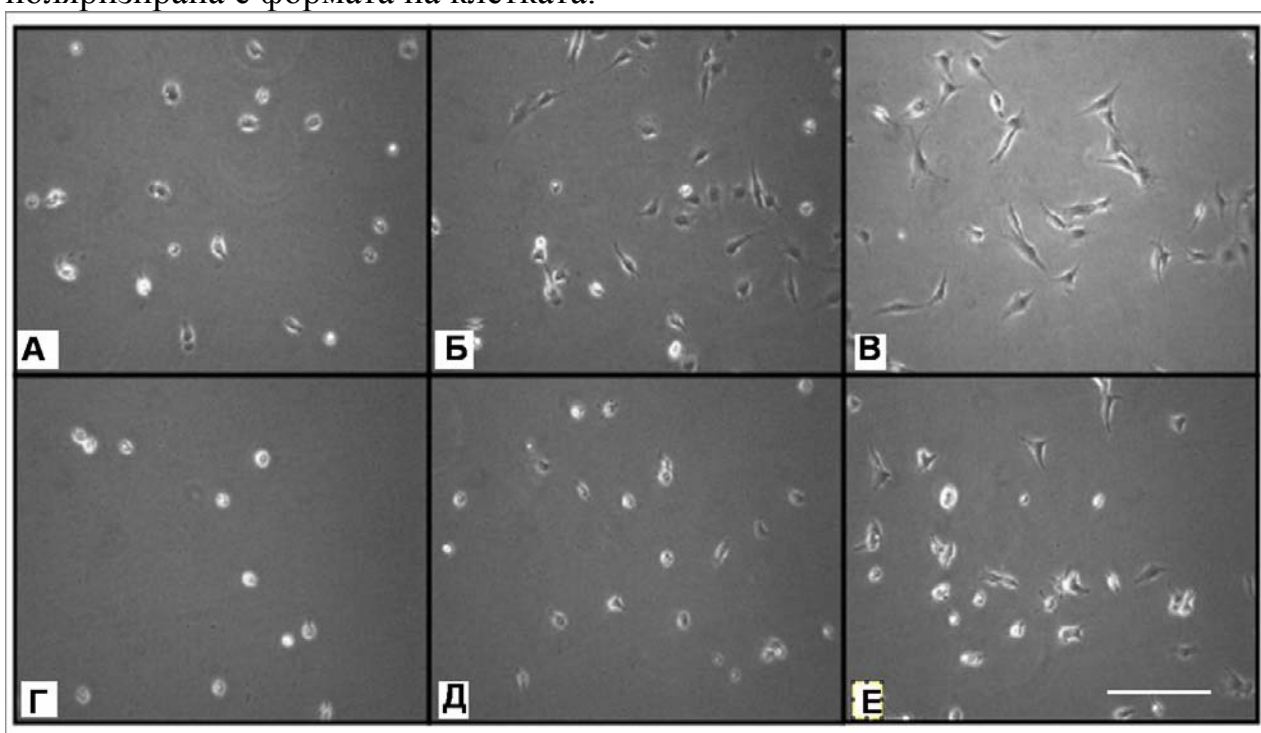
**Фиг 3.1.1** Адхезия на MG-63 клетки след 4 часа инкубация върху стъкло ( ▨ ) и непокрита ПЕМ ( □ ) както и ПЕМ покрити с 0.5 µg/ mL пФн ( ▩ ) и 5 µg/ mL пФн ( ■ ). Мултислоеве са получени при различни стойности на рН (P5H5C5 = рН 5/ P7H7C5 = рН 7/ P9H9C5 = рН 9); средната група от колони е с

терминален хитозанов слой P(НС)<sub>4</sub> докато групата от дясно е с терминален слой от хепарин P(НС)<sub>4</sub>Н

Резултатите представени на фиг.3.1.1 показват че всички непокрита с Фн мултислоеве (представени с бели колони), без значение дали са с хепарин

или хитозан като терминален слой, са сравнително цитофобни, тъй като само малък брой клетки адхезират. Също така и стойността на рН по време на отлагането на слоевете нямаше значим ефект върху клетъчната адхезия. Единствено при ПЕМ с терминален слой от хитозан Р7Н7С5 получен при рН 7 се наблюдава слабо увеличаване на броя на адхериралите клетки. Адсорбцията на пФн с концентрация само 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  води до значително повишаване на клетъчната адхезия върху всички терминални слоеве (заштриховани колони). ПЕМ завършващи с хитозан - Р5Н5С5 (рН 5) и Р7Н7С5 показват по-големи стойности в сравнение с хепарин терминаращите мултислоеве получени при същата комбинация на рН. В общи линии резултатите от експериментите показаха, че комбинацията Р9Н9С5 (рН 9) е по-адхезивна за МG-63 клетките в сравнение с Р7Н7С5 и Р5Н5С5. На фиг. 3.1.1 може да се види също, че адсорбцията на пФн дори в ниска концентрация като 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (черни колони) води до почти два пъти по-висок брой на адхериралите клетки спрямо този върху 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  пФн. В съответствие с по-ниската концентрация на пФн, повече клетки се наблюдават върху Р9Н9С5 последвано от Р7Н7С5 и Р5Н5С5. По-ниска адхезия на МG-63 клетки бе наблюдавана върху всички хепарин терминарани мултислоеве. При тях се забелязва същата зависимост по отношение на рН стойностите каквато беше открита и при хитозан терминаращите мултислоеве.

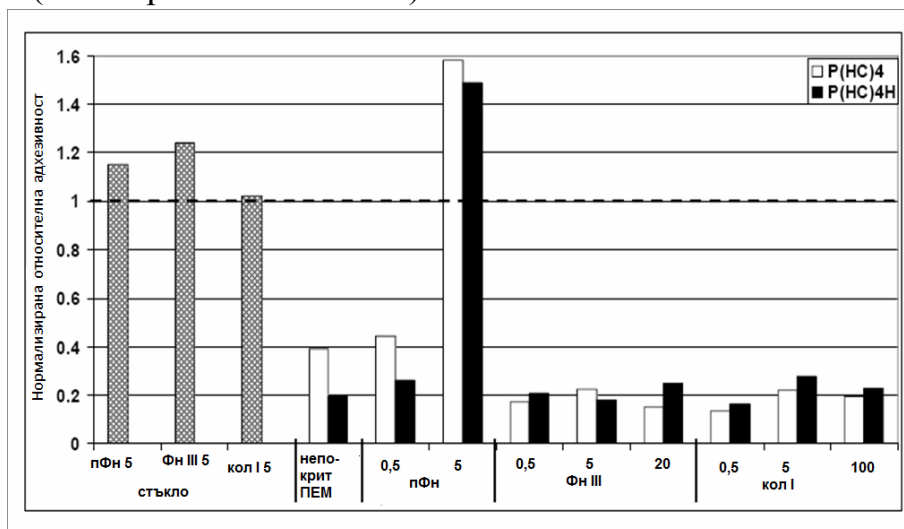
Освен броят на клетките, тяхната морфология може да се смята за допълнително средство за оценка на клетъчната адхезия. Колкото по-добро е взаимодействието между клетката и биоматериала, толкова по-разстлана и поляризирана е формата на клетката.



**Фиг.3.1.2** МG-63 клетки върху ПЕМ покрити с 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  пФн; хитозан терминаращи Р(НС)<sub>4</sub> (А, Б, В) и хепарин терминаращи Р(НС)<sub>4</sub>Н (Г, Д, Е) при Р5Н5С5 (А, Г), Р7Н7С5 (Б, Д) и Р9Н9С5 (В, Е), бар - 100 $\mu\text{m}$ .

На Фиг.3.1.2 се вижда как клетките от клетъчна линия MG-63 имат различно поведение върху ПЕМ с различен строеж след преадсорбцията на 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  пФн. Като резултат от това формата на клетките върху хепарин е по-окръглена (Г - Е), а тези които са върху хитозанов терминален слой са по-спредирали (А-В). Това ни кара да заключим, че  $\text{P}(\text{HC})_4$  подпомага клетъчната адхезия, докато  $\text{P}(\text{HC})_4\text{H}$  води до по-слабо прикрепяне и разстилане. Различия има и при отделните рН условия по време на изграждането на мултислоеве. Клетките инкубирани върху  $\text{P5H5C5}$  (А и Г) демонстрират най-ниска степен на разстилане, която се увеличава с нарастване стойността на рН. Най-добре са спредирали клетките върху  $\text{P9H9C5}$  (В и Е). Вземайки предвид предимството на мултислоеве с терминален слой хитозан пред тези с хепарин можем да кажем, че върху пробата  $\text{P9H9C5}$  с  $\text{P}(\text{HC})_4$  (Фиг.3.1.2 В) се проявява най-добре спредингът на клетките, които са с големи размери.

Друг подход, който използвахме бе да адсорбираме различни белтъци върху стъкло и ПЕМ. За адсорбирането използвахме плазмен Фибронектин (пФн), фрагмент III от Фн, който представлява мултимер от RGD доменът, но без домените за свързване с хепарин и клетки; колаген (кол I). След като резултатите разкриха сходна тенденция за всички комбинации от стойности на рН тук ще покажем само тези за рН комбинацията  $\text{P7H7C5}$ . Всички стойности на Фиг. 3.1.3 са представени като нормализирани спрямо непокритото стъкло (отговаря на стойност 1).



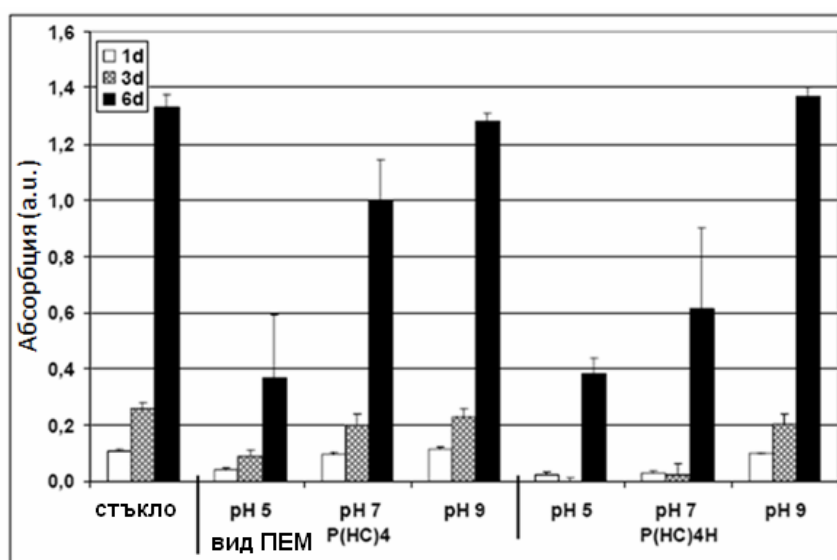
**Фиг.3.1.3** Адхезия на MG-63 клетки след 4 часа инкубация върху различни повърхности нормализирани към непокритото стъкло като контрола непокритото стъкло и покрито с пФн, Фн III, кол I (■); ПЕМ (хитозан тримиращи- □ и хепарин тримиращи- ■): непокрити, покрити с пФн, Фн III и кол I. Протеините са в различна концентрация означена в

[ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].

Адсорбцията на разтвор с концентрация 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  от всеки белтък върху стъкло (щриховани колони), предизвика умерено нарастване на броят на клетките в сравнение с непокритото стъкло. Важно е да отбележим, че Фн III фрагментът имаше същият ефект върху клетъчната адхезия както и пФн. За разлика от това, ако различните протеини са адсорбирани върху ПЕМ, само пФн има засилващ ефект върху адхезията. За сравнение могат да бъдат погледнати резултатите за клетъчната адхезия при 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  пФн, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Фн III и 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  колаген I. Същият ефект, но с различна величина бе наблюдаван и при ПЕМ формиранни при рН съответно  $\text{P5H5C5}$  или  $\text{P9H9C5}$  (данните не са показани).

Беше изследвана и пролиферацията на клетките върху непокрита с белтъци ПЕМ, но в среда с 10% съдържание на FCS. Както може да се види на Фиг. 3.1.4, стойностите показват способността на MG-63 клетките първоначално да адхезират и след това да се размножават по време на 6 дневното изследване.

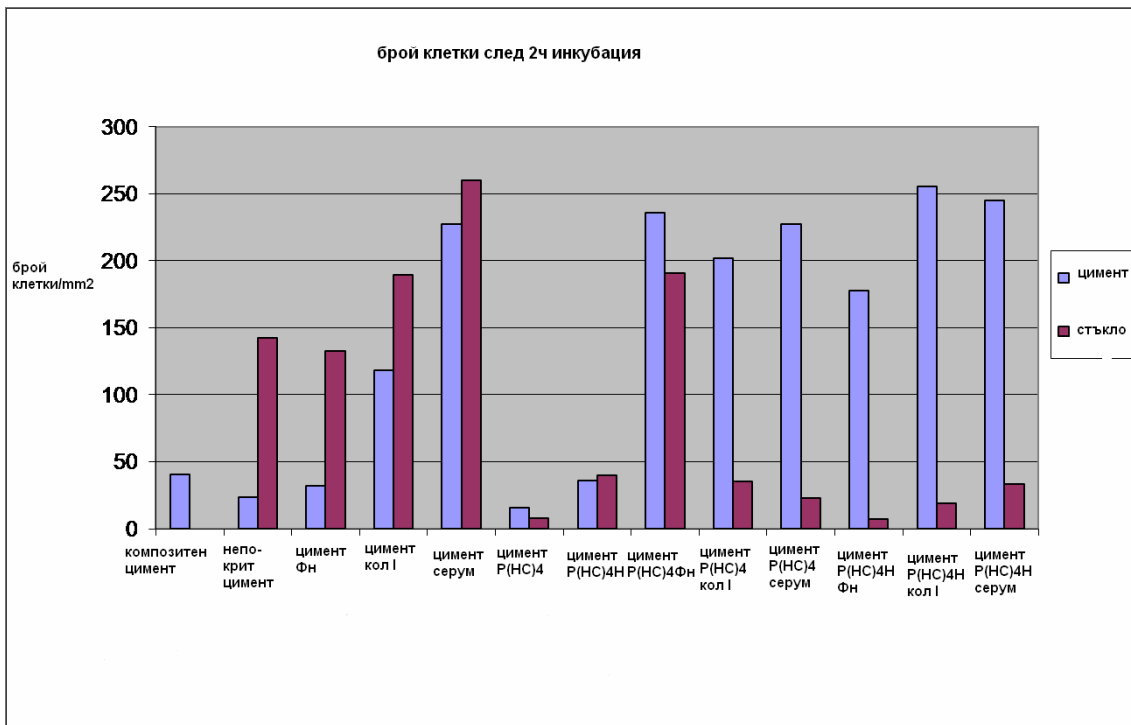
Както се очакваше, броят на клетките се увеличава от първият ден (бели колони) през трети ден (защриховани колони) до шестия ден (черни колони). Стойностите са около или под тези за контролата стъкло (групата колони от ляво). В повечето случаи, хитозан терминацията ПЕМ показват сравним клетъчен растеж с този върху хепарин терминацията получен при същото рН. В добавка на това пролиферацията е най-добра при Р9Н9С5 (рН 9) и при двата терминални слоя, с малко предимство за хитозан терминацията ПЕМ. Данните за клетъчната пролиферация при другите комбинации на рН, както следва Р7Н7С5 (рН 7) и Р5Н5С5 (рН 5) показват спад в броя на клетките. Трябва да се отбележи, че при комбинацията от рН (Р7Н7С5) хитозан терминацията слоеве са много по-благоприятстващи клетъчната пролиферация, в сравнение с хепарин терминацията.



**Фиг.3.1.4.** Пролиферация на MG-63 клетки след 1 ден (□), 3 дни (▨) и 6 дни (■) инкубирани върху стъкло (трите колони в лявата част на графиката) и ПЕМ с различно рН по време на формирането на слоевете (Р5Н5С5 = рН 5/ Р7Н7С5 = рН 7/ Р9Н9С5 = рН 9); Р(НС)<sub>4</sub> (групата колони в средата) и Р(НС)<sub>4</sub>Н (групата колони вдясно на графиката)

### 3.2 Взаимодействие на човешки остеобласти с мултислоеве, отложени върху $\alpha$ -ТСР цименти

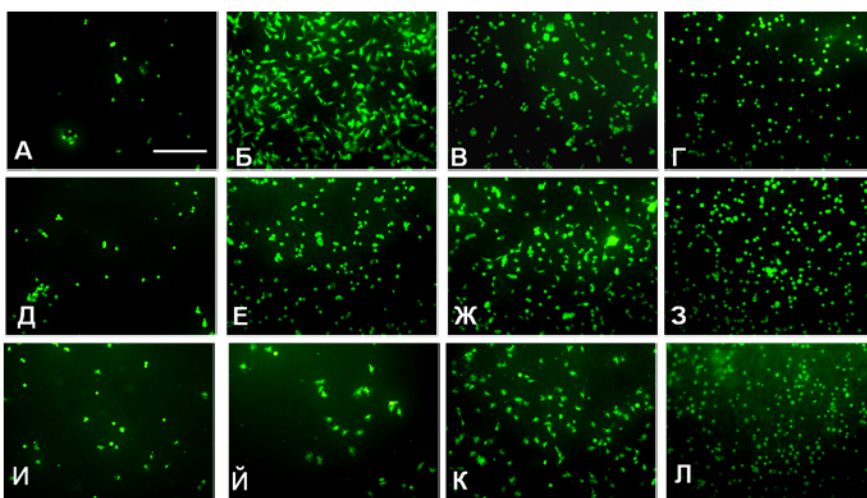
Целта на това изследване беше да се провери дали модифицирането на  $\alpha$  ТСР циментите с отлагане на мултислоеве може да подобри взаимодействието с остеобласти. След описаните по-горе експерименти в предишната глава се спряхме на оптимално за отливането на слоевете рН=9 (Р9Н9С5). Първо, бяха изследвани композитни цименти спрямо такива покрити с различни белтъци и серум или с мултислоеве с хитозан и хепарин като терминален слой по отношение на адхезията на клетки от клетъчна линия MG-63. За сравнение като моделна система бяха използвани стъкла обработени по същият начин.



**Фиг. 3.2.1.** Адхезия на MG 63 клетки след 2 часа инкубация върху чист, композитен и цемент покрит с 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Фн, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  колаген и сыворотка (лява половина на графиката) и върху цименти покрити със слоеве с терминален слой хитозан и хепарин (средата) и след това с адсорбирани протеини върху различните терминални слоеве (дясна част на графиката)

Резултатите представени на фиг.3.2.1 показват, че всички покрити с мултислоеве цименти без значение дали са с хепарин или хитозан като терминален слой и с адсорбирани върху тях Фн, колаген и сыворотка са сравнително цитофилни, тъй като голям брой клетки адхезират към тях. В сравнение с тях, чистият, композитния, както и този с адсорбирани белтъци цемент, демонстрират много по-слаба адхезия (лявата част на графиката)

Освен броят на клетките, допълнително средство за оценка на клетъчната адхезия е тяхната морфология. Колкото по-добро е взаимодействието между клетката и биоматериала, толкова по-разстлана и поляризирана е формата на клетката.



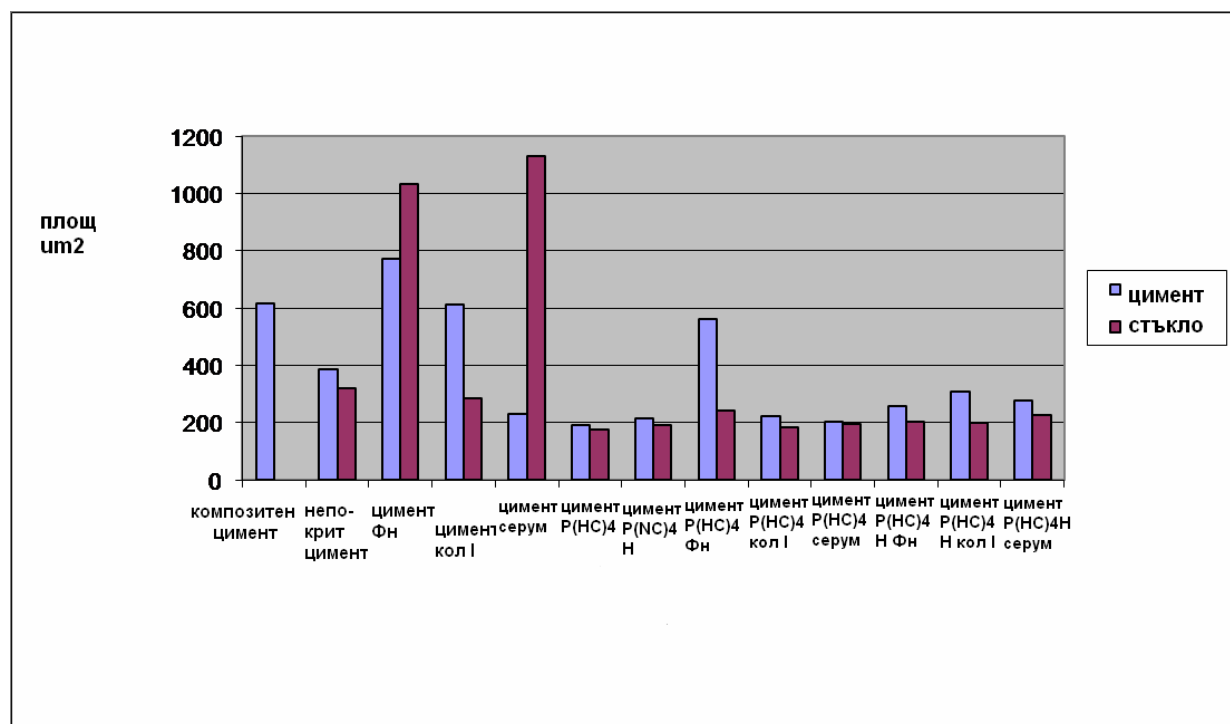
**Фиг.3.2.2:** Обща морфология на MG 63 клетки инкубирани 2 часа върху цименти покрити със слоеве с терминален слой хитозан (А, Б, В, Г) и хепарин (Д, Е, Ж, З) и след това с адсорбирани протеини –Фн (Б, Е), Колаген тип I (В, Ж) и сыворотка (Г, З) и върху чист (И), цемент покрит с 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Фн (Й), 100.  $\mu\text{g}/\text{mL}$  колаген (К), сыворотка

покрит цемент(Л). Бар - 100 $\mu\text{m}$ .



На Фиг.3.2.2 се вижда как клетките от клетъчна линия MG-63 имат различно поведение върху цименти покрити с ПЕМ с различен терминален слой и след преадсорбцията на 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  пФн, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  колаген и серум, както и върху върху чист цимент и покрит с протеини. Като резултат от това формата на клетките върху хепарин е по-окръглена, както и на тези които са върху хитозанов терминален слой. Значително по-голям спрединг клетките демонстрират върху цементите покрити с ПЕМ с различен терминален слой и след преадсорбцията на 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  пФн, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  колаген и серум. Сред тях с най-висока степен на разстилане на клетките върху изследвания материал се отличава циметът покрит с ПЕМ с терминален слой хитозан и адсорбиран Фн. Това ни кара да заключим, че цимент  $\text{P}(\text{HC})_4\text{Фн}$  подпомага клетъчната адхезия, докато цементите със слоеве и неадсорбирани протеини водят до по-слабо прикрепяне и спрединг. От тази фигура също така ясно се вижда, че броят на клетките върху цементовите образци без отложени полиелектролитни слоеве е по-малък, но тяхната форма е силно поляризирана и са много по-добре разстлани. Най-силно спредирали са клетките инкубирани върху Фн покритият цимент.

Количествените данни за площта на клетките представени на Фиг.3.2.3, подкрепят резултатите за клетъчната адхезия от предходните фигури.



**Фиг 3.2.3.** Морфология на MG-63 клетки след 2 часа инкубация върху чист, композитен и цимент покрит с 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Фн, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  колаген и серум (лява половина на графиката) и върху цименти покрити с ПЕМ с терминален слой хитозан и хепарин (средата) и след това с адсорбирани протеини върху различните терминални слоеве (дясна част на графиката)

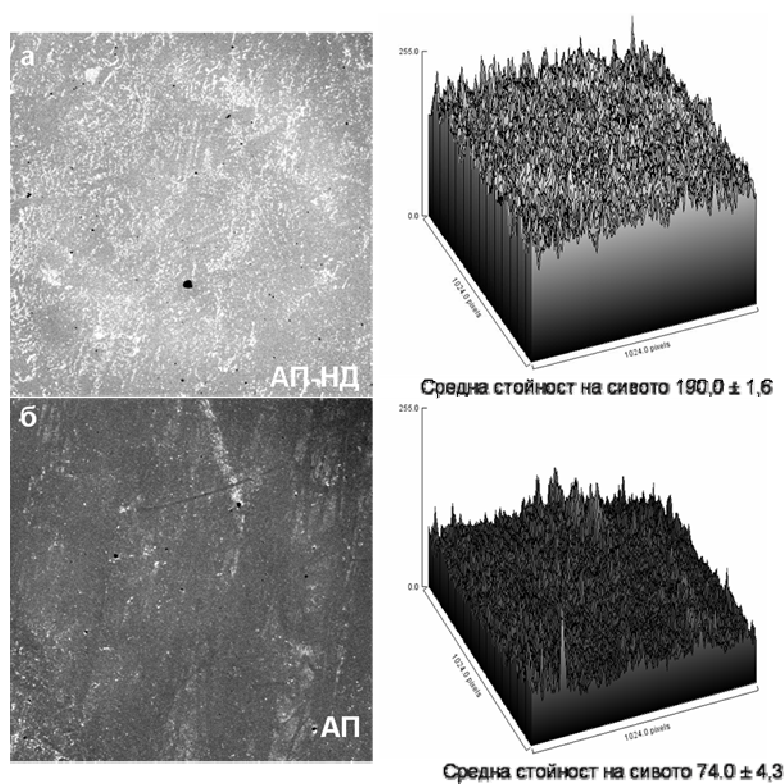
Площта на клетките се увеличава при цементите с адсорбирани белтъци и серум, а формата им става все по-неправилна. Най-добър спрединг на клетките има върху цементите покрити с 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  концентрация на Фн и при композитният цимент. От друга страна резултатите ни показват, че покриването на цементите със полиелектролитни слоеве и след това с

протеини не засилват разстилането на клетките. Площта на клетките е относително малка и сравнима с тази на непокрытите ПЕМ тъй като клетките остават окръглени. Изключение тук прави само цимент с терминален слой хитозан, и адсорбиран с Фн.

## 4 Биологично характеризирание на ХА НД покрития

### 4.1 Адсорбция на Фн

Има четири различни морфологични състояния при спонтанната адсорбция на Фн върху хидроксиапатит-базирани покрития: хомогенно, под формата на агрегати, като изолирани или свързани [100]. За да проследим начинът на адсорбиране на Фн върху АП-НД покрития ние маркирахме Фн с FITC точно преди адсорбцията в еднобелтъчна система и наблюдавахме пробите на LSCM в z-stack режим.



**Фиг.4.1.** 2D и 3D конфокални изображения на адсорбиран FITC-Фн върху АП-НД (а) и чисто АП (б) покрития (снимките са направени на LSCM, увеличение 40x).

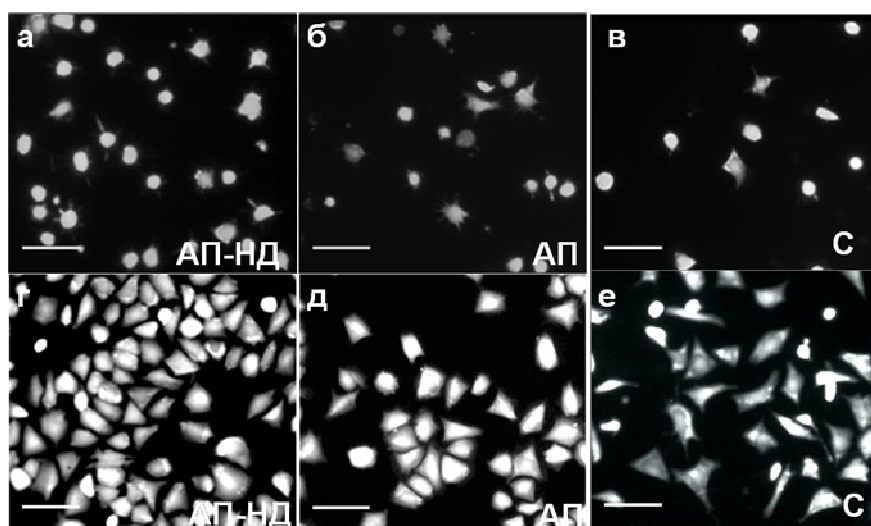
При този експеримент не наблюдавахме спонтанно формиране на фибрили, но сравнявайки снимките направени при максимална проекция, установихме че има значително по-голяма адсорбция на Фн върху пробите от АП-НД в сравнение с тези от АП (Фиг.4.1).

Анализът на интензитета на флуоресценцията, измерен в сиви пиксели (данни получени от 5 различни LSCM снимки) в различни участъци на пробата, също разкри значително повишаване на адсорбираният FITC-Фн към АП-НД (средната стойност на сивото е  $190.0 \pm 1.6$ ) в сравнение с чистия АП (средна стойност на сивото  $74.0 \pm 4.3$ ). Моделът на адсорбиране на Фн е доста хетерогенен (Фиг.4.1.), с типичните точковидни структури, които често се групират в ивичести мотиви и върху двата вида проби, вероятно следвайки

организацията на АП кристали. Не се наблюдава формиране на Фн фибрили, които да провокират по-силно свързване с клетките [100, 101, 102]. Извън тази подредба Фн адсорбира хомогенно. Наблюдаваните резултати не е задължително да означават че няма малки фибрили, тъй като може да са с размери под оптичната резолюция.

#### 4.2. Инициална адхезия - ефекти на серума, Фн и Вн

За подробното характеризиране на биосъвместимостта на тези нови покрития беше проучена инициалната адхезия на MG-63 клетки върху непокрита и серум покрити проби след *in vitro* инкубация от 2 часа. Общата морфология на клетките върху непокрита АП-НД, АП и стомана е представена на фиг.4.2. (а - в). Въпреки, че клетките се прикрепят малко по-добре върху АП-НД, те не са достатъчно разстлани върху непокритите проби и следователно имат предимно окръглена форма. Количествените резултати за клетъчната адхезия не показват значително увеличение (около 20 %) на броят на клетките върху АП-НД (фиг.4.2.- а). Няма разлика в адхезията между чистите апатитни покрития и стоманата (С) (фиг.4.2.-б - в).



**Фиг. 4.2.** Обща морфология на MG-63 клетки култивирани за 2 часа върху чисти (а - в) и серум-покрити АП-НД, АП или С (г - е) проби (FDA витално оцветяване, бар 100  $\mu\text{m}$ ).

Покриването със серум значително подобрява взаимодействието на клетките с всички проби (фиг.4.2.- г - е). Както клетъчната адхезия (таблица 1) така и спединга на клетките (таблица 2) значително се увеличава в сравнение с непокритите повърхности

проба	Брой клетки/ $\text{mm}^2$				
	Вн 1 $\mu\text{g/ml}$	Фн 1 $\mu\text{g/ml}$	Фн 20 $\mu\text{g/ml}$	FCS	непокрити
АП	98,8 $\pm$ 19,5	60,25 $\pm$ 3,9	62,5 $\pm$ 5,3	107,5 $\pm$ 22,9	57,5 $\pm$ 10,1
АП-НД	69,5 $\pm$ 10,7	87 $\pm$ 6,1	69,3 $\pm$ 17,2	141,5 $\pm$ 23,3	69,3 $\pm$ 10,9

**Таблица 1:** Брой на клетките след след 2 часа култивиране в среда без серум.

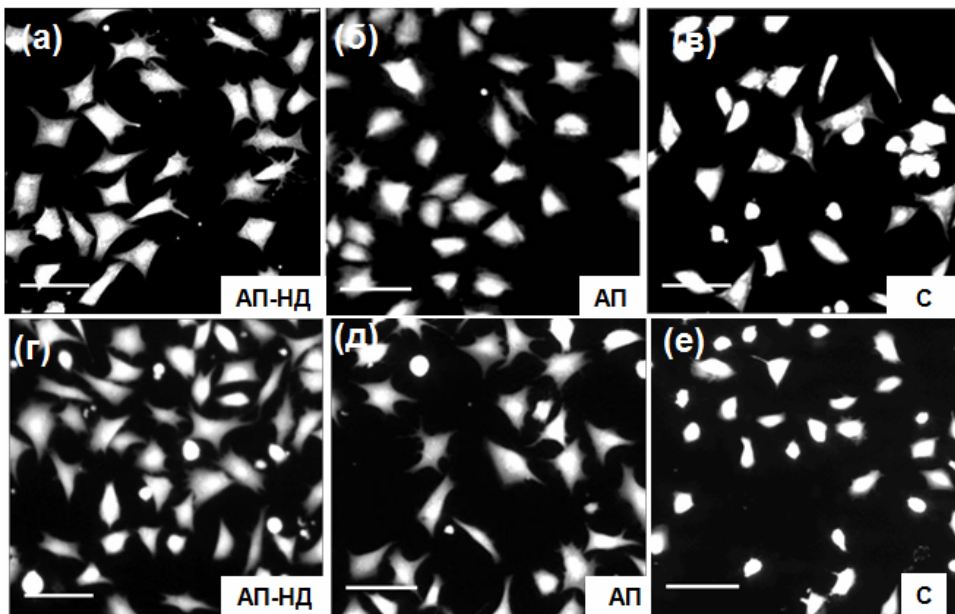


проба	Площ на разстилане на клетките ( $\mu\text{m}^2$ )				
	Вн 1 $\mu\text{g/ml}$	Фн 1 $\mu\text{g/ml}$	Фн20 $\mu\text{g/ml}$	FCS	непокрити
АП	1078 $\pm$ 484	1431 $\pm$ 603	1836 $\pm$ 718	1284 $\pm$ 393	715 $\pm$ 312
АП-НД	1277 $\pm$ 635	1533 $\pm$ 697	1663 $\pm$ 759	1414 $\pm$ 521	800 $\pm$ 315

**Таблица 2:** Площ на разстилане на MG-63 след 2 часа култивиране в среда без серум.

Все пак адхезията на MG-63 клетки е значително по-висока върху АП-НД (фиг.4.2. г): по-малко клетки има върху АП проби (фиг.4.2. д). Увеличението на спрединга върху пробите от АП-НД не е статистически значимо ( $p < 0.05$ ).

Както е известно от литературата, основните адхезивни белтъци са Фн и Вн. Приемайки, че количеството на Фн е относително малко то следващата стъпка, която предприехме беше да изследваме неговото влияние. Резултатите представени на Фиг. 4.3. (а - в) показват, че Фн също подобрява адхезията еднакво върху материалите, особено, ако е адсорбиран от изходна концентрация 20  $\mu\text{g/ml}$ . Изглежда, че ефектът е зависим от използваната за покриването концентрацията. Изненадващо за нас, установихме значително подобрене в клетъчния отговор към АП-НД материал при много по-ниската концентрация от изходната (Фиг. 4.3. г), в сравнение с чистия АП (Фиг. 4.3. д).

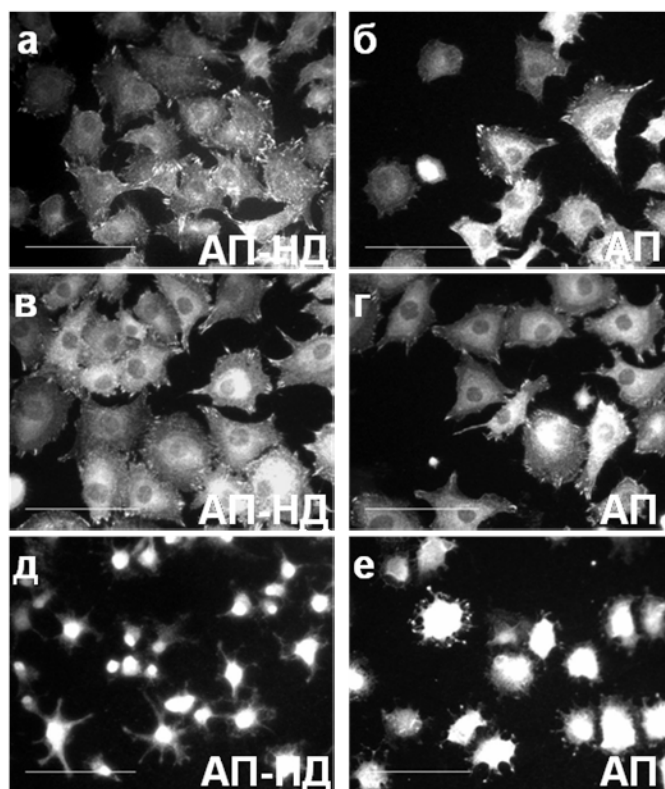


**Фиг. 4.3.** Обща морфология на MG-63 клетки култивирани за 2 часа върху чисти Фн-покрити АП-НД, АП или С проби при висока 20  $\mu\text{g/ml}$ . (а - в) и ниска концентрация 1  $\mu\text{g/ml}$ . (г, д, е), (FDA витално оцветяване, бар 100  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.3. Развитие на фокалния адхезионен комплекс

Друг подход, чрез който можем да научим повече за ефективността на взаимодействието между клетката и изследвания материал е като проследим формирането на фокалните адхезионни комплекси. Фокалните адхезии са местата, където се осъществява действителният физически контакт с повърхността на материала [103]. За да визуализираме тези структури ние използвахме имунофлуоресценция за винкулин, основният цитоскелетен белтък

от който се състоят фокалните адхезионни комплекси. Както може да се види на Фиг. 4.4 (д, е) върху непокрытите повърхности не се наблюдава съществено образуване на фокални контакти, което е в съответствие със слабата адхезия и спрединг на клетките описани по-горе (Фиг.4.2). Въпреки това, върху АП-НД има повече клетки в съответствие с подобрената адхезия към непокрыти повърхности, което беше дискутирано по-горе. Все пак върху серум и Фн-покрытите проби (фиг.4.4. а - г), клетките добиват плоска морфология (както може да се наблюдава на Фиг. 4.2. г - е), което е в подкрепа на добре развитите фокалните адхезионни комплекси. Фокалните адхезии са по-добре изразени върху пробите от АП-НД, което предполага по-силно клетъчно взаимодействие както върху серум покритите така и върху Фн-покрытите повърхности. Това е особено подчертано, когато се сравнят с непокрытите проби и разкрива важността на адсорбираният Фн.



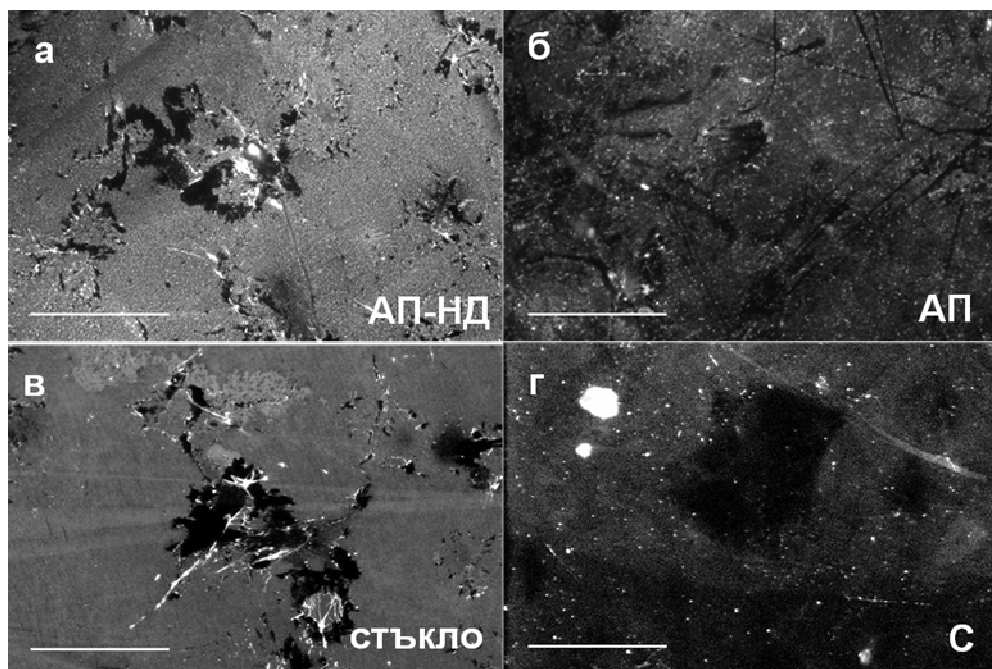
**Фиг 4.4.** Обща морфология и формиране на фокални адхезии при MG-63 клетки инкубирани за 2 часа върху АП-НД (а, в, д) и чисти АП (б, г, е). Пробите са покрити със серум (а, б), с Фн (в, г) или непокрыти (д, е) (оцветяване за винкулин; бар 100 μm).

#### 4.4. Реорганизация на фибронектинов матрикс

Добре документирано е, че много типове клетки като фибробластите и ендотелните клетки не само се прикрепят към адсорбираният Фн, но също така могат и да го реорганизират във фибрилоподобна форма, вероятно

като опит да организират собствен матрикс [86, 104, 105]. Тъй като някои повърхности спомагат Фн реорганизация докато други не и това зависи от тяхната биосъвместимост, ние решихме да разберем повече за ранното формиране на Фн матрикс върху проби от АП и АП-НД в контакт с остеобласт подобни клетки от клетъчна линия MG-63. За тази цел култивирахме клетките в продължение на 5 часа върху FITC-Фн покрити АП и АП-НД, както и върху С и стъкло като контроли. Както може да се види на Фиг.4.5. (а, в), клетките върху АП-НД повърхността реорганизират много добре Фн по начин почти неразличим от този върху позитивната контрола от стъкло. Премахнатият от остеобластите Фн изглежда като тъмна ивица на иначе светлият флуоресцентен фон. Този Фн в последствие е организиран в линейни матрикс-подобни структури разположени под или над клетките. Този резултат предполага, че дори и в големи количества Фн е слабо свързан върху АП-НД

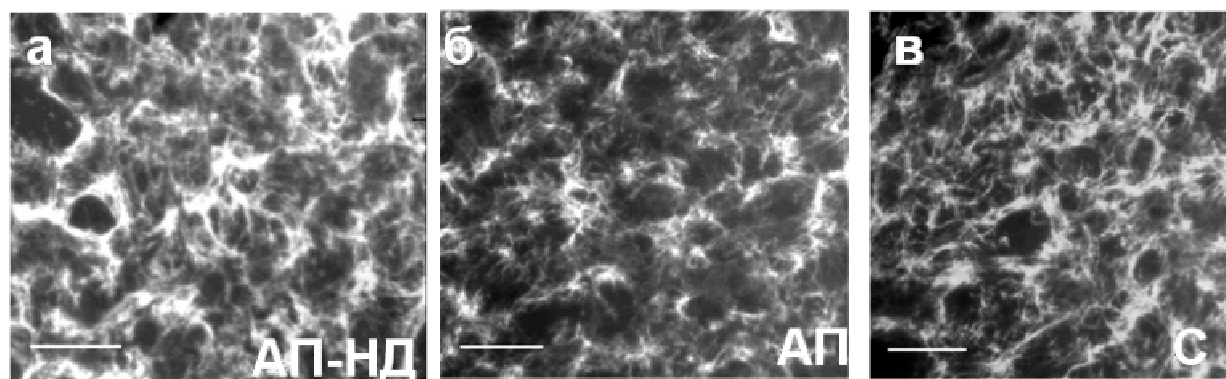
покрытие (по такъв начин, че клетките да могат лесно да го отстраняват и реорганизируют в матрикс-подобна структура), което е от полза за биосъвместимостта [86, 104, 105]. За разлика от това АП и С контролната повърхност (Фиг.4.5. б, г) представят тъмни ивици и сенки на отстраненият от клетките Фн и само малки участъци на реорганизация, което говори за намалена матрикс-формираща активност. Трябва да се отбележи, че този ефект може би е предизвикан от по-слабата адсорбция на Фн.



**Фиг.4.5.** Реорганизация на Фн матрикс върху АП-НД (а) и АП (б) покрития сравнени с контролни стъкло (в) и С (г) повърхности, бар 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5. Формиране на Фн матрикс

При по-продължителна инкубация остеобластите произвеждат и отлагат свой собствен остеогенен матрикс върху материала [106], който съдържа колаген, протеоглигани и Фн [107]. Следователно, за да научим повече за това дали първоначалната разлика в адсорбцията на Фн ще повлияе на последващото развитие на Фн матрикс, култивирахме MG-63 клетки за 72 часа и визуализирахме Фн чрез имунофлуоресценция.



**Фиг.4.6.** Отлагане на късен Фн матрикс върху АП-НД (а) и АП (б) покрития сравнени със С (в) повърхности. (Имунофлуоресцентно оцветяване за Фн, бар 100  $\mu\text{m}$ ).

Множество светли фибрили формиращи мрежа бяха наблюдавани при всички проби (Фиг.4.6.), което сигнализира за доста независим от материала механизъм на образуване на матрикс. Обаче може да се предположи склонност към по-силно отлагане на Фн матрикс върху АП-НД (Фиг.4.6. а), в сравнение с пробите от АП (Фиг.4.6. б) и стоманената контролна повърхност (Фиг. 4.6. в)

## VI. Обсъждане

Биологичната съвместимост е понятие, което все още търси своята дефиниция в съвременната литература [108]. В повечето случаи, за да се определи даден материал като биосъвместим, се изисква той да е биоразградим, инертен и безвреден, и да се понася добре от тъканите без да нарушава тяхната функция. За някои съвременни биоинженерни направления обаче, каквито са например създаването на изкуствени тъкани и/или органи, се разви понятието биовградимост, т.е. адекватното взаимодействие на материала с тъканта. Постепенно се налага становището, че „междуфазовите” проблеми с приемащата биологична тъкан следва да се намалят до минимум [109]. Нещо повече, все по-усърдно се търси активното взаимодействие на материалите с нативната тъкан, което да стимулира естествените регенеративни механизми. Напоследък вниманието се насочва към потенциала на тъканите да се самовъзстановяват (когато това е възможно), което е в основата на съвременната концепция за регенеративна медицина. Тук биоматериалите трябва да притежават необходимите свойства, за да развият този потенциал за регенерация. Те трябва да взаимодействат адекватно с тъканите и да предоставят необходимата „правилна информация” на клетките, те от своя страна да я възприемат и отговорят по подходящия начин [110]. Един от подходите за осъществяване на такъв контрол върху биологичния отговор са адекватните биохимични, химични или физикохимични модификации на биоматериалите. В това отношение опитите за заместване на костната тъкан са от съществен медицински интерес и са пример за едно авангардно тъканно инженерство. От една страна костната тъкан е втората най-трансплантируема тъкан след кръвта [111], а от друга, съчетава в себе си относително структурно постоянство и забележителен регенерационен потенциал.

В последните десетилетия, с навлизането на тъканното инженерство в медицината, се постигнаха изненадващо добри резултати в областта на костното заместване. Все по-голяма популярност придобиват биокерамиките и в частност - калциево-фосфатните цименти, които след втвърдяването си се превръщат в хидроксиапатит – минералната субстанция на костната тъкан [112]. Именно в това направление са насочени и усилията на нашия екип, част от които е и настоящата работа.

$\alpha$ -Трикалциевият фосфат е от определен интерес за заместване на костната тъкан, тъй като при хидратация образува кристали от калций-дефицитен хидроксиапатит (CDHA), стоящ най- близо в структурно отношение до костния минерал [28]. Ето защо беше интересно да научим повече за биологичният отговор към този материал, и за това как тези

кристали се разпознават от живите клетки. С други думи използвахме един биологичен подход за да анализираме как структурата на цимента и евентуалните добавки към него влияят на неговата биологична активност в система *in vitro*.

Преди всичко искахме да определим влиянието на размера на частиците на изходния цимент върху неговата кристализация и как това се отразява на взаимодействието му с живи клетки (остеобласти). От предишни публикации [28] се знаеше, че предоставените ни FINE-цименти, при втвърдяването си образуват по-дребни и по-гъсто разположени кристали от ХА, което води до по-голямата им контактна повърхност с водата, а от там, и повече „нуклеационни места“ за преципитация на калциевия фосфат. Нашите наблюдения всъщност потвърдиха този факт. С цел обаче да се доближим максимално до нативната костна структура, ние решихме да добавим в състава на циментовата паста колаген.

Нашите резултати показаха явна промяна в повърхностната морфология на циментите при добаянето на колаген. Повърхностните кристали са по-гъсто и по-равномерно разпределени, като този ефект е особено подчертан при FINE- композитния цимент, явно повлиян от по-голямата обща повърхност на частиците.

Клетъчната адхезия *in vitro* е един феномен, който адекватно отразява първоначалното взаимодействие на тъканите с биоматериали [114]. Това беше и нашият основен подход. Постарахме се да изследваме общата клетъчна морфология при контакт с повърхността на циментите, както и някои количествените параметри на адхезията. Тук е мястото да отбележим, че това не беше проста задача. Поради релефната повърхност на циментите, водеща до рефракция, както и поради тяхната оптическа непрозрачност, имахме сериозни проблеми при наблюдението на адхезираните клетки. Повечето изследвания в тази насока [115] използват сканиращата електронна микроскопия, където клетките са фиксирани, дехидрирани и наслоени с метал. Ето защо трудно може да се приеме, че тя възпроизвежда истинската клетъчна морфология. Използването на виталното багрило флуоресцеин диацетат (FDA), позволяващо наблюдение на живите клетки под флуорисцентен микроскоп, всъщност реши този проблем.

Друг принос на настоящия труд е свързан с опитите ни за функционализиране на циментовата повърхност чрез преадсорбция на фибронектин, покриването им с ПЕМ, както и чрез директното добавяне на колаген към циментите. Колагенът е основен компонент на екстрацелуларния матрикс [113], но същевременно той играе изключително важна роля и за структурната организация в костната тъкан. Знае се много за организацията на колагена в костите, но твърде малко са изследванията относно неговите свойства като адхезивен белтък, който според съвременните представи се разпознава от клетките и предизвиква специфичен биологичен отговор [117]. Фибрилизацията на колагените по време на втвърдяването на циментите е един спорен въпрос [118]. Всъщност в литературата не е ясно дали въобще се осъществява фибрилизация, а това е основната и биологически активна форма на колагена. Нашите резултати показват, че добавката на колаген не променя



съществено биологичния отговор на циментите. Ето защо, наблюдаваните ефекти следва да се отнесат по-скоро до структурната промяна в повърхността на цимента. А що се отнася до ефектите на другите адхезивни белтъци (фибронектин, серум), те бяха адсорбирани върху повърхността на циментите. Известно е, че фибронектина до голяма степен определя първоначалното взаимодействие на клетките с чужди повърхности. Ето защо, преадсорбирането с Фн и неговият ефект върху клетъчната адхезия характеризира до голяма степен биологичните свойства на тази повърхност. Това беше и нашият експериментален подход. Резултатите ни показаха, че Фн се адсорбира в такава конфигурация, която се разпознава от клетките, което потвърждава данните, че хидроксиапатитните цименти са биосъвместими и остеоинтегративни.

От нашите предварителни резултати (не са представени в дисертационния труд тъй като са включени в дипломна работа ( Д. Гугутков, 2006.)) заключихме, че първоначалният афинитет към хидроксиапатита е по-добре изявен при остеобластите, което е по-добре проявено при FINE-циметите. Това определи и нашия избор на вида цимет за следващите експерименти.

Изборът на видовете клетки, с които да продължим изследванията си, беше определен от това, че остеобластите са основния участник в остеогенезата, а на стволовите клетки се възлагат големи надежди в тъканното инженерство и в литературата има редица данни за успешното им прилагане.

Проведените от нас експерименти бяха съсредоточени основно върху началната адхезия на клетките към материалите (композитен цимент и некомпозитен покрит с Фн). И при двата вида клетки наблюдавахме подобен отговор, а именно, преимуществена адхезия към колаген-циментовия композитен материал в сравнение с Фн покрития цимент. Сравнявайки двата вида клетки, можем да кажем, че MG 63 клетките се прикрепят добре върху композитния материал, но не са достатъчно разстлани, докато върху Фн-покритите проби клетките имат предимно поляризирана форма. От друга страна мезенхимните стволови клетки не само се прикрепят по-добре към композитния цимент, но при тях се наблюдава и по-добро разстилане върху изследвания материал. По-продължителни изследвания, обаче показаха, че доброто взаимодействие на стволовите клетки е временно и последващата инкубация води до тяхното отлепване. Още на 24 час след инкубацията върху изследваните материали се наблюдава значително намаление на броят на клетките (резултатите не са показани).

В обобщение можем да кажем, че циментите проявяват сравнително добра биологична активност, но очевидно има какво още да се желае. Ето защо продължихме изследванията в тази насока като използвахме техника за модификация наречена *layer-by-layer*. Това е един алтернативен подход за получаване на покрития наподобяващи биологичните повърхности и от там подобряващи биосъвместимостта на имплантите. Тези покрития могат да съдържат специфични лиганди за клетъчната адхезия и растежни рецептори [69], различни адхезивни протеини или биологично активни пептиди [119-121], включително и биологично активни полизахариди. В действителност,

антикоагулиращото действие на хепарина се изследва от десетилетия, чрез имобилизацията му върху повърхността на биоматериали с цел да предотврати кръвосъсирването [122, 123]. Но освен антикоагулиращият си ефект, който се дължи основно на специфично взаимодействие на хепарина с антиромбин III [123, 124], хепаринът може да се свързва и с множество други молекули, както например адхезивните белтъци както е Фн и растежни фактори, като фибробластните растежни фактори [90, 125]. Следователно покриването на материалите с хепарин може да доведе до селективно свързване на белтъци от заобикалящата течна среда (серума), а това от своя страна прави гликозаминогликаните изключително интересни „партньори” при разработката на биоактивни покрития. Това се вижда също и от нарастващата им употреба за модифициране на импланти и скафолди в тъканното инженерство. [126, 127].

Другият полизахарид, който използвахме в изграждането на нашите мултислоеве е хитозанът. Той е изграден от глюкозамин с различни нива на N-ацетил глюкозамин, който е биосъвместим, адхезивен и положително зареден. Хитозанът е биоразградим и притежава ангиогенни способности, когато се постави в трудно зарастващи рани [128]. В литературата има данни за прилагането на стабилизирани с хитозан кръвени съсирек в мястото на микроструктурен хрущялен дефект, в резултат на което се наблюдава по-добро възстановяване на трабекуларната кост и хиалиновият хрущял [129, 130, 131]. Други изследвания показват, че вкарването на модифицирана хитозанова гъба в остеохондрални дупки на кондилите на овца предизвиква по-пълно възстановяване на костта след 20 и 40 дни, в сравнение с контролите [132]. Във ветеринарната практика също има доказателства за положителното въздействие на хитозана, където се наблюдава ускорено възстановяване на костни фрактури при кучета [133].

Изследванията ни относно това дали полиелектролитните мултислоеве могат да бъдат използвани за да се контролира адхезията на клетките от клетъчна линия MG-63 започнаха първо със стъкло и получените резултати бяха обнадеждаващи. Съществено заключение от тези изследвания беше, че прост параметър като стойността на рН на електролитния разтвор, може да бъде използван като инструмент, с който да се контролира адсорбцията на мултислоеве, а от там и адхезията на остеобластните клетки, както и последващият им разтеж. Полиелектролитните мултислоеве сами по себе си са слабо адхезивни [136]. За да придобият по-добра адхезивност към тях могат да се свържат белтъци, като Фн. В този случай беше използвано специфичното взаимодействие на глюкозаминогликана хепарин със съответните домени за свързването му в молекулата на Фн [137].

Характеризирането на биоматериалната повърхност е съществено за разбирането на клетъчното поведение [138]. Една от отличителните черти на LbL метода е, че се променя химията на повърхността без да използва химическо модифициране [69, 70, 71]. Полиетиленимина и хитозана използвани от нас са слаби поликатиони, съдържащи аминок-групи. Те правят повърхността по-малко хидрофилна, което се изразява в по-големите контактни ъгли, близки по стойност на тези измерени при амин-

терминиращите самоорганизиращи се монослоеве върху стъкло [139]. От друга страна хепаринът като полианион съдържа сулфатни и карбоксилни групи, което води до получаването на хидрофилна повърхност. Промяната на контактните ъгли беше използвана за да се проследи напредването на послойното отлагане.

Показано е, че при слабите електролити стойността на рН на полиелектролитния разтвор контролира заряда и конформацията им [71, 140-142]. Следователно и промените в рН влияят върху качествата на мултислоеве изградени от слаби полиелектролити, каквито са полиетиленimina и хитозана. Първият пример за тази връзка е ефектът на промените в рН върху адсорбцията на полиетиленimina. Измерванията показаха, че контактният ъгъл се увеличава след адсорбцията му с нарастваща стойност на рН. Следователно повърхностният заряд е този, който контролира процеса на адсорбция. Хитозанът като слаб поликатион (рКа около 6,5) също се влияе от промените на рН. Тъй като хитозанът е неразтворим при по-високи стойности на рН, неговата адсорбция бе осъществена при рН 5. Въпреки това зарядът и конформацията на адсорбираният хитозан могат да бъдат повлияни също така и от промените в рН на заобикалящите го течности. Хепаринът бидейки силен електролит, обаче, е силно дисоцииран при всички стойности на рН, които използвахме (рКа около 3). Следователно промените в стойностите на рН, които използвахме в настоящата работа, нямаха директно отражение върху зарядът и конформацията му. От това следва, че при конструкта P5H5C5 (слоеве от полиетиленimin, хепарин и хитозан отложени при рН 5), където хитозана е силно зареден и може да адсорбира добре върху предшестващия го слой от хепарин, което води до характерно компенсиране на заряда и адсорбиране на големи количества. Това на свой ред позволява по-силната адсорбция на хепарин върху положително заредената повърхност на мултислоя с хитозан по време на следващата стъпка от адсорбцията [143]. Различно е в случая, когато рН конструкта е P9H9C5 (рН е 9, 9, 5 съответно), където вече адсорбираният към ПЕМ хитозан е по-слабо зареден и може да свърже по-малко хепарин, въпреки че е силно дисоцииран. Конструктът P7H7C5 до определена степен е по средата между двата случая. Хитозанът може да е частично зареден, което зависи от неговият състав и нивото на деацетилиране, а хепаринът по принцип е добре дисоцииран. Резултата е, че може да има нарастване на броя на слоевете, но не в такива количества каквито могат да се адсорбират при ниските стойности на рН. Следователно ПЕМ получени при ниско рН вероятно са по-дебели, а отделните слоеве са организирани по-раздалечено, докато ПЕМ формирани при по-високи стойности на рН са по-тънки, а двата електролита са доста размесени. Това е ефект от съответния заряд и причинената от него конформация на полиелектролитите [71]. Друго последствие от различната дебелина на слоевете може да е и разликата във вискоеластичните свойства на мултислоеве. Показано е, че по-вискоеластичните мултислоеве инхибират клетъчната адхезия и спрединг, докато тези, които са по-твърди промотират гореспоменатите процеси [144]. Това се подкрепя и от по-ранна публикация,



отнасяща се за ефекта на механичните характеристики на субстрата върху прикрепянето на клетките [145].

Адсорбцията на белтъка и последващите адхезия и пролиферация на клетките върху повърхността на биоматериала се определят от неговите физико-химични характеристики [146]. В частност, повърхностния заряд на биоматериала директно рефлектира върху свързването на протеина и прикрепянето на клетките, както и тяхното размножаване. В литературата е известно, че биоматериали със силен отрицателен заряд могат да намалят адсорбцията на специфични белтъци, като Фн и да ограничат прикрепянето на клетките, докато повърхности с основни функционални групи, като аминокрупите, които водят до по-малко положителни или отрицателни заряди, могат да привлекат белтъци и клетки [147, 148]. В контекста на това могат да се дискутират изводите от нашите изследвания. Например слабата адхезия на клетките от клетъчна линия MG-63 върху непокрит с адхезивен фактор хепарин терминаращ ПЕМ, вероятно се дължи на факта че във физиологични условия има отрицателен повърхностен потенциал и силна омокряемост. Тъй като всички клетки имат общ отрицателен заряд [149], то чистият хепарин терминаращ ПЕМ вероятно отблъсква клетките. Хитозанът от друга страна притежава като основни функционални групи - аминокрупите, които са положително заредени и следователно има по-скоро привличащ ефект върху клетките.

Остеобластите имат разнообразие от интегринови рецептори [38], които им позволяват да се свързват с много от белтъците на екстрацелуларният матрикс, като Фн, остеоонектин, различните типове колаген и др. [38]. Следователно слабата способност на ПЕМ да привличат клетките може да бъде компенсирана с адсорбирането на адхезивни белтъци като Фн. Действително, Фн засилва клетъчната адхезия върху всички ПЕМ конструкции. Хитозан терминаращите слоеве подобряват прилепването на клетките, което може би се дължи на неговия положителен заряд (т.е. на аминокрупите с основен характер) в сравнение с отрицателно заредения хепарин, съдържащ киселите сулфатни и карбоксилни групи. В потвърждение на това е фактът, че плазменият Фн се свързва повече към аминокрупите, отколкото към карбоксилни групи [150]. Факта, че Фн е слабо отрицателно зареден във физиологични условия (рКа около 5.6-6.1) подкрепя резултатите от настоящето изследване [148]. Освен самото количество на адсорбирания белтък, също така неговата конформация и начин на свързване оказват голямо значение [151]. В допълнение на общото подобрене на адхезията от Фн, има и различия между рН конструктите, които могат да бъдат обяснени с промяната в свойствата на мултислоевите. Конструктите получени при ниска стойност на рН имат качества наподобяващи тези на хидро гелове и се отличават с по-слаба адхезивност, докато тези получени при по-високите стойности на рН (Р9Н9С5), са по-компактни и с нехомогенна повърхност, като е възможно полиелектролитите от съседните слоеве да се смесват. В последния случай, присъствието както на хепарин така и на хитозан в един слой вероятно е отговорно за повишената адхезия на клетките.

Аналогично обяснение може да се даде и за пролиферацията, която зависи от предходните процеси на адсорбция на белтъка и прилепване на клетките [89]. Пролиферацията на клетките показва същата тенденция. Организацията на мултислоевите и произлизащите от нея механични различия, както и степента на разнородност между ПЕМ изглежда имат голямо въздействие върху растежа на клетките, особено при високата стойност на рН, Р9Н9С5.

Настоящата работа доказва, че ПЕМ могат да отключат специфични механизми на взаимодействие между молекулите както например при хепарина и плазменият Фн [125, 152]. За разлика от плазменият Фн, Фн III (синтетичен фибронектин, който включва само домен III от цялата молекула) и колаген тип I не подобряват клетъчната адхезия както в сравними така и в по-високи концентрации на белтъка върху мултислоя. В действителност обаче всички те имат способност да взаимодействат с MG-63 клетките, благодарение на наличието на последователност за свързване с клетки, като RGD [90]. Само плазменият Фн, обаче има свързващ домен за хепарин, докато Фн III и колаген тип I нямат такъв домен. Това ни кара да допуснем, че големия капацитет за свързване на пФн може да се обясни с биоспецифичното му взаимодействие с хепарина от вътрешността на ПЕМ. Сходството по отношение на клетъчната адхезия, между хитозан и хепарин терминиращите мултислоеве след преадсорбцията на пФн допълнително потвърждава, че хепарина и хитозана се смесват в границите на един слой, което беше споменато по-горе. Подобни наблюдения за смесени или нестабилни мултислоеве са докладвани вече в литературата [41, 153]. Следователно възможно е пФн да се свързва с хепарина дори той да не е терминалният слой. Противоположен е случаят при контролното стъкло, където липсва специфичното свързване между хепарин и Фн, а всички белтъци стимулират клетъчната адхезия в почти еднаква степен.

Като заключение от тези изследвания може да се каже, че LbL техниката е подходящ метод за модифициране на биоматериални повърхности когато целим да се контролира тяхното поведение. Адхезията на остеобластите се променя за сметка на специфичното взаимодействие между гликозаминогликаните и белтъците, което е част от естествените процеси в ЕЦМ на тъканите като костта [154]. Всъщност нашите изследвания показват, че можем да наподобим това взаимодействие.

Една друга възможност за биофункционализиране на имплантите предназначени за костно заместване е покриването им с хидроксиапатит (ХА). ХА е добре биосъвместим неорганичен материал от апатитното семейство и се интегрира добре в костната тъкан, вероятно поради химическото си сходство с костите и зъбите на бозайниците [48, 156, 157]. Поради тази причина често металните импланти са покривани с ХА с цел да се подобри адаптацията към костта. [48, 156]. Молекулният механизъм стоящ зад това улеснено интегриране в костната тъкан все още не е много ясен и обикновено се приписва на механичното сходство на този материал със заобикалящите тъкани. Ние допуснахме, че това се дължи на голямата способност на ХА да адсорбират протеини от ЕЦМ, което от своя страна води до по-добро взаимодействие с клетките, както и отлагане на матрикс. Тъй като

остеобластите са основните клетки в костния матрикс, тяхното успешно взаимодействие би ни помогнало да вникнем в механизмите на неговото взаимодействие с костната тъкан [156]. Остеобластите експресират различни интегринови рецептори, които се свързват с голям афинитет към белтъците на ЕЦМ каквито са Фн, остеонектина и различните колагени [158]. В този смисъл, взаимодействието им с даден материала следва да се разглежда в контекста на разпознаването на тези белтъци. Добре известно е, че имплантираният материал незабавно се покрива със слой от белтъци адсорбиращи се от кръвта или телесните течности. Следователно белтъците са тези, които клетките “усещат”, и с които взаимодействат, а не самата повърхност [158]. Всъщност, нашите проучвания показват, че покриването на пробите със серум значително подобрява клетъчното взаимодействие, като то обаче е особено силно изразено при добавянето на нанодиамантни частици, т.е. върху АП-НД покрития. Това повдига въпроса кои са белтъците, които участват в този процес. И в това отношение ефекта на Фн е много важен поради факта, че той е основният адхезивен белтък в биологичните течности, въпреки че в търговските серуми количеството му е много малко, поради това, че той се свързва с Фибрина по време на кръвосъсирването [80]. За да проследим чистия ефект на Фн ние използвахме система, в която има само един белтък – Фн. Действително повишеното количество адсорбиран FITC-Фн към повърхността на АП-НД, предполага специфичното му взаимодействие с този материал. Нашето предположение е, че по-голямото количество на адсорбирания белтък (спрямо чистият АП) се дължи на присъствието на НД частици. Според литературата този наноразмерен материал притежава извънредно голяма повърхностна площ, има повърхностен заряд и експресира различни функционални групи, като  $\text{OH}^-$ ,  $\text{COOH}^-$ ,  $\text{NH}_2^+$  или  $\text{SO}_3\text{H}^-$ , които са резултат от процеса на детонация [159, 160]. Ето защо се смята, че НД могат да имат биомедицинско приложение [161]. Ясно е, обаче, че не само адсорбирането на биологични молекули, но и тяхната конформация влияе върху последващият клетъчен отговор. Има четири различни морфологични модела на адсорбция на Фн: (i) хомогенно, (ii) под формата на агрегати, (iii) като изолирани фибрили, или (iv) като свързани помежду си фибрили [100]. Всъщност снимките от Фиг. 4.1. показват, че адсорбцията на Фн върху двата вида покрития, АП и АП-НД, е доста хетерогенна, наподобяваща точковидни агрегати, които често се организират в линейни структури, вероятно следвайки спонтанната организация на АП кристали. Тъй като тези линейни структури бяха явно изразени върху пробите от АП-НД ние допуснахме, че спонтанното образуване на такива ориентирани структури също може да спомогне за клетъчното взаимодействие [38, 100, 102]. Въпреки, че не беше наблюдавано формиране на Фн фибрили, това не означава със сигурност, че такива малки микро/нанофибрили липсват, тъй като оптичната разделителна способност на конвенционалната флуоресцентна микроскопия може да е недостатъчна. Извън тези структурирани зони Фн показва хомогенен модел на адсорбция.

Редица проучвания показват, че адхезията на клетките и тяхното разстилане е силно зависимо от конформацията на адсорбираният белтък.

Настоящото изследване показва, че АП-НД задейства специфично взаимодействие с молекулата на Фн и тъй както неговата фибрилизация зависи от концентрацията [161]. Въз основа на това ние предположихме, че взаимодействието му с клетките също зависи от тази концентрация, което е индиректно доказателство, че ефектът, който има серума върху АП-НД покрития се дължи на по-силния афинитет на този материал към Фн, което компенсира по-малкото му количество [80].

Друг подход, чрез който можем да научим повече за ефективността на взаимодействието между клетките и изследвания субстрат е като проследим формирането на фокалните адхезионни комплекси. Именно те определят истинската физична адхезия на клетките към субстрата и свидетелстват за успешното преминаване на биологичните сигнали към вътрешността на клетката с основно участие на интегриновите рецептори [162]. Въпреки, че не сме изследвали конкретно разпределението на интегриновите рецептори участващи в разпознаването на Фн, ние показваме същата корелация между формирането на фокалните комплекси и подобреното взаимодействие на остеобластите, както върху серум, така и върху Фн покритията АП-НД повърхности. Това отново потвърждава, че подобрената клетъчна адхезивност на АП-НД е резултат от по-големия афинитет към свързване на Фн.

По-ранни проучвания в нашата лаборатория показаха, че за да бъде един материал биосъвместим, трябва да адсорбира матриксни белтъци слабо, вероятно за да могат клетките да организират свой собствен матрикс [86, 104, 105]. Настоящите резултати показват, че остеобластите са склонни да реорганизируют адсорбираният Фн много по-добре върху АП-НД повърхност, което ни води до предположението, че Фн е свързан относително хлабаво, т.е. клетките могат лесно да го отстранят от субстрата и да го организират в линейна структура наподобяваща матрикса [86, 104, 105]. Интересното е, че при АП и стоманата не се наблюдава такава тенденция, но не може да се изключи, че намалената реорганизационна активност на клетките върху чист АП и стомана е свързана с по-малкото количество адсорбиран Фн. И все пак, по-добрата биосъвместимост на АП-НД покрития, отново се потвърждава от резултатите за формирането на “късен” матрикс, демонстриращи по-силно отлагане на матриксни фибрили от Фн върху тези материали.

### **Изводи**

1. Разработена е техника за изготвяне и характеризиране на образци от  $\alpha$ -ТСР цименти подходящи за биологични изследвания
  - Присъствието на колаген в течната фаза на  $\alpha$ -ТСР циментите предизвиква ускорено образуване на хидроксиапатитните кристали и по-бързо достигане на крайната твърдост
  - Хидроксиапатитните кристали в цимента са по-равномерно разпределени и по-гъсти при колагеновите композити
  - Остеобластите взаимодействат по-добре с колаген-композитните цименти.

2. Осъществено е повърхностно модифициране на хидроксиапатитните цименти чрез формиране на полиелектролитни мултислоеви от хепарин и хитозан
  - Променяйки стойността на рН по време на отлагане на мултислоя може да се модулира клетъчното взаимодействие
  - Инициалната адхезия на остеобластите е по-добра при отлагане на мултислоя при рН=9.
  - Преадсорбцията с фибронектин, колаген или серум на модифицираните  $\alpha$ -ТСР цименти подобрява инициалната адхезия на остеобласти
3. Разработена е техника за нанасяне на хидроксиапатитни и композитни нанодиамантни покрития върху метални импланти
  - Включването на нанодиаманти в хидроксиапатитните покрития води до увеличаване адсорбцията на фибронектин
  - Инициалната адхезия на остеобластите е по-добра при добавката на нанодиаманти
  - Преасорбцията със серум, фибронектин или витронектин подобрява клетъчното взаимодействие, но е демонстрирана водещата роля на фибронектина

#### **Приноси на дисертационния труд**

1. Намерена е подходяща *in vitro* методика за изследване взаимодействието на живи клетки (остеобласти и мезенхимни стволови клетки) с различни  $\alpha$ -ТСР цименти и биоактивни хидроксиапатитни покрития предназначени за костно-заместващи импланти
2. Характеризиран е ефекта от добавянето на колаген върху физико-химичните и биологични качества.  $\alpha$ -ТСР цементите
3. Намерени са условия за получаването на биологично активни полиелектролитни мултислоеви върху  $\alpha$ -ТСР цименти и други моделни повърхности

#### **Научни публикации свързани с дисертацията**

1. K. Kirchhof, **K. Hristova**, N. Krasteva, G. Altankov, Th. Groth Multilayer coatings on biomaterials for control of MG-63 osteoblast adhesion and growth. *J Mater Sci: Mater Med* (2009) 20:897–907
2. **K. Hristova**, E. Pecheva, L. Pramatarova, G. Altankov. Improved Interaction of Osteoblast-like Cells with Apatite-Nanodiamond Coatings Depends on Fibronectin *J Mater Sci: Mater Med* (2011) 22:1891–1900
3. E. Pecheva, L. Pramatarova, T. Hikov, **K. Hristova**, G. Altankov, P. Montgomery, T. Hanawa. Electrodeposition of hydroxyapatite-nanodiamond composite coating on metals. Interaction with proteins and osteoblast-like cells. Book chapter in “*Electrodeposition: Properties, Processes and Applications*” Nova Publishers, USA (in press)

*Материалите по защитата са отпечатани с финансовото съдействие на договор ДО 02/178 на МОМН*