

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

И-Т ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ,
ПАТОЛОГИЯ И АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ

Вх. №

70

12.03

2021

РЕЦЕНЗИЯ

СОФИЯ

от доц. д-р Иванка Цачева,

Катедра Биохимия, БФ, СУ „Св. Климент Охридски“

Относно: Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен
„Доктор“

в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.3. „Биологически науки“,
научна специалност Морфология (шифър: 01.06.26),

на тема: „ **ПРОУЧВАНИЯ IN VITRO ВЪРХУ ЦИТОСЪВМЕСТИМОСТТА И ОС-
ТЕОИНДУКТИВНОСТТА НА НОВИ МАТЕРИАЛИ ЗА КОСТНИ ЗАМЕСТИТЕ-
ЛИ** “

Докторант: Бойка Димитрова Андонова-Лилова, Институт по експериментална
морфология, патология и антропология с музей, БАН

Научен ръководител: проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор

От доста време костно-ставните заболявания (КСЗ) са сериозен проблем за човечеството. По данни на СЗО честотата на фрактури в резултат от КСЗ е сравнима с честотата на поява на рак на дебелото черво, едно раково заболяване, което се отличава с малък процент на наследствена предразположеност и подобно на КСЗ до голяма степен зависи от метаболитния статус на човешкия организъм. Предпоставки за задълбочаването на проблема с мащаба на КСЗ се откриват в редица аспекти на съвременния начин на живот. По статистически оценки, публикувани в научната литература, приблизително 80% от населението на планетата е дефицитно по отношение на витамин D, който е пряко свързан с костната хомеостаза. Голям процент от населението от женски пол страда от различни нарушения във функционирането на щитовидната жлеза, които, съчетани с отделни минерални дефицити, ги правят метаболитно уязвими за КСЗ. Друга обезпокоителна тенденция при жените е намаляване на възрастта, при която настъпва менопауза, период от живота, в който податливостта към КСЗ се повишава. В същата посока действа и друго обективно обстоятелство – застаряването на населението в световен мащаб, което е особено силно изразено в страните от Европа. Всички тези предпоставки засилват натиска върху научната общност да търси и да намира решения за биосъвместими и имунологично

приемливи заместители на костна тъкан. В този смисъл дисертационният труд на Бойка Андонова-Лилова е разработен в особено актуално научно направление, което има непосредствено клинично приложение с пряко отражение върху качеството на живот.

Дисертационният труд на Бойка Андонова-Лилова е структуриран по добре приетия класически модел – след Въведение от 3 страници, в което се аргументира актуалността на научната разработка следват 51 страници Литературен обзор, 1 страница Цел и задачи, 37 страници Материали и методи, впечатляващите 124 страници Резултати, 1 страница Изводи и 1 страница Приноси. Посочени са 159 литературни източника.

Литературният обзор въвежда читателя в тематиката на научния труд с лекота и интелигентно поставена мярка относно степента на молекулни подробности, с които е характеризирана костната тъкан. Представени са съставът и структурата на костите, клетъчните им компоненти (по произход, степен на диференциация и функция) и тяхната метаболитна обвързаност с костната хомеостаза. Разгледани са анатомичната характеристика на различните видове кости, процесът на ремодулиране и ендокринни фактори, които пряко му влияят, функциите и механичните свойства на костите. Описани са патологични изменения в костите и ставите, свързани с фрактури и инфекциозни заболявания. Разгледани са смущения в развитието на костите с фокус върху остеопороза, представени са механизмите за възникването им в степен, до която са изучени. Направена е сравнителна характеристика на съвременните биоматериали за костни заместители (керамики, метали, естествени и синтетични полимери, композити). Дискутирано е модерното направление костно тъканно инженерство (КТИ), представено като костно тъканно моделиране (КТМ). Разгледани са инструментите, използвани за тъканно инженерство - костно мозъчни клетки, мезенхимни стволови клетки (МСК), целуларни и ацелуларни системи, както и направата на 3D матрици като костни заместители и като среда за култивиране на използваните клетки, позволяваща остеогенеза, остеокондукция и остеоиндукция. Посочено е важното предимство на използването на 3D биопринтиране при тъканното инженерство за осигуряване от една страна на алтернатива на автоложни и алогенни тъканни импланти, а от друга – да се замени тестването върху животни за изследване на болести и разработване на лечебни подходи. Анализирани са изяснените части от молекулните механизми, участващи в диференциацията на МСК, с цел правилното им манипулиране *in vivo* и *ex vivo* за регенерация на цели тъкани и органи.

Характеризирани са в сравнителен план използваните животински модели с техните предимства и недостатъци за *in vivo* проучвания на костни заместители.

Литературният обзор съдържа 22 фигури, всяка от които подходящо онагледява описанието в текста. Тази глава демонстрира отличната, задълбочена теоретична подготовка, с която Бойка е подхождала към провеждането на експерименталната част.

Целта на дисертационния труд е 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. За изпълнение на целта са поставени три типа задачи - да се оптимизират условията за оценяване на цитотоксичния ефект на изпитваните КФМ; да се изследва цитотоксичния и генотоксичния ефект на тестираните КФМ върху човешки и животински клетъчни линии; да се анализира способността на КФМ да стимулират остеогенната диференциация на човешки МСК от мастна тъкан.

В научната разработка са включени 21 новосинтезирани КФМ от три групи - прахови образци от модифицирани с метали КФМ (група 1), композитни материали (група 2) и цименти (група 3). Методологията включва рутинно клетъчно култивиране на постоянни клетъчни линии, както и получаване на първични клетъчни култури от костен мозък на мишка и плъх, изолиране и култивиране на мезенхимни стволови клетки от костен мозък на мишка, изолиране и култивиране на мезенхимни стволови клетки от адипозна тъкан на човек; флоуцитометрично фенотипизиране на човешките стволови клетки от адипозна тъкан; методи за изследване на клетъчна преживяемост и пролиферативна активност (цитотоксични тестове - МТТ, NR и CV); методи за изследване на клетъчна морфология и адхезивна способност (оцветяване с хематоксилин и еозин, с акридин оранж и пропидиев йодид, сканираща електронна микроскопия); *Single Cell Gel Electrophoresis* ("*Comet assay*") за анализ на генотоксичен ефект; биохимични методи (остеогенна диференциация, определяне на ензимна активност) и др.

Глава Материали и методи демонстрира високо ниво на експериментални умения и аналитична зрялост при съставянето и изпълнението на практическата част от дисертационния труд.

Целта е осъществена чрез мащабен, комбиниран експериментален дизайн (резултатите са илюстрирани със 103 фигури, отразяващи експерименталните данни), който включва директни и индиректни анализи за установяване на потенциалната

цитотоксичност на проучваните КФМ, сравняване на преживяемостта и растежния потенциал на клетките, върху които се извършват анализите, в зависимост от: а) вида и количеството на използвания КФМ, б) клетъчната гъстота и в) продължителност на култивиране.

Като резултат от работата е установено, че КФМ от Група 1, модифицирани с Zn(II) и/или Mg(II) (с изключение на (Zn7)) не повлияват съществено преживяемостта и пролиферативната активност на култивираните човешки и миши ембрионални фибробластоидни клетки. Периодът на култивиране също не е фактор, който влияе на клетъчната преживяемост и пролиферативна активност. Установена е по-висока чувствителност към цитотоксичното действие на изпитваните КФМ при миши костномозъчни клетки в сравнение с ембрионалните миши фибробласти от линия BALB/c 3T3, като пролиферативната активност и/или преживяемостта на клетките намалява с увеличаване на времето на третиране. Най-висока клетъчна преживяемост/пролиферативна активност се установява при два КФМ - Mg3 (99.77% на 144 час при мишите костномозъчни клетки) и Mg7 (82.46% на 144 час при плъшите костномозъчни клетки). Не се установява промени в клетъчната преживяемост и при КФМ от Група 1, модифицирани със Sr. Материалите от тази група не оказват значим цитопатологичен или генотоксичен ефект.

Композитните материали от Група 2 също не намаляват преживяемостта на клетките, като при третиране с W19 и W20 удълженото време на култивиране води до увеличение в броя на живите миши и плъши КМК (в присъствие на W17 се установява намаление).

Циментите от Група 3 стимулират преживяемостта / пролиферативната активност на клетките с удължаване на времето на инкубация при директните експерименти, а при индиректните – с удължаване на периода на инкубиране на материала в хранителната среда, с изключение на КФМ-АСР-ТА-Na, който проявява цитотоксичен ефект. Материалите от тази група показват висока цитосъвместимост при човешките МСК, като най-висока преживяемост / пролиферативна активност е намерен при МСК, култивирани в диференцираща остеогенна среда, инкубирана предварително в присъствие на АСР-ТА. При същите условия не се установяват цитопатологични изменения, като същевременно се наблюдава отлагане на калциеви кристали и продукция на алкална фосфатаза в човешките МСК от адипозна тъкан, което е показателно за остеогенна диференциация на тези клетки.

Отлично впечатление прави анализът в глава Обсъждане на цялостния подход при изработване на дисертационния труд - подбор на моделни системи, подготовка на пробите за анализ, резултатите от експериментите, съгласуване на работата с установени световни стандарти. Тази дискусия затвърждава убеждението ми, че работата по настоящия дисертационен труд има оригинален принос за комплексно охарактеризиране на анализирани материали.

Приемам изводите така, както са формулирани, като достоверно отражение на експерименталните резултати. Дисертационният труд има оригинални приноси по отношение на цитосъвместимостта на 21 нови материали за костни заместители, както и по отношение на Цимента АСР-ТА, който е разпознат като нов цитосъвместим и остеоиндуктивен материал, способен да стимулира пролиферацията и остеогенната диференциация на човешки МСК от адипозна тъкан. А приложният принос се изразява в създаването на комплексен подход за оценка на цитосъвместимостта и остеоиндуктивността на калциево-форфатни материали за костни заместители.

Големият обем експериментални резултати от дисертационния труд са публикувани в 14 статии, една от които е в списание с имакт фактор.

Изпълнението на експериментална работа и писменото оформление на дисертационния труд представят Бойка Андонова-Лилова като изграден изследовател с аналитичен похват и широки практически умения. Дисертационният труд и публикациите, свързани с него, надхвърлят значително изискванията за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, което ми дава основание убедено да подкрепя присъждането на степента на Бойка Андонова-Лилова.

11.03.2021

София

Подпис:

Ivanka

Digitally signed by
Ivanka Tsacheva
Date: 2021.03.11
22:55:30 +02'00'

Иванка Цачева