



Резюме на проект по Фонд „Наука“ № 19027 – Конкурсна сесия 2019:

„Биопринтиране и морфологичен анализ на 3D матрица за биосинтетични импланти с повишен остеогенен потенциал“

Ръководител: Доц. д-р Стоян Павлов Павлов, дм

Изграждането на биосинтетични импланти чрез триизмерен печат (биопринтинг) представлява метод, при който контролиран от компютър робот изработва физически обект. Триизмерния обект представлява пространствено-контролирано триизмерно скеле (scaffold), което имитира морфологията на екстрацелуларния матрикс и бива изградено чрез инжекционно или пневматично 3D екструдирание на хидрогел, произведен от биополимери, които нормално се намират в екстрацелуларния матрикс на човешкия организъм (колаген, еластин, хиалуронова киселина и др.), изолират се от животински и растителни видове (алгинат, цитосан, метилцелулоза) или са добити по синтетичен път (полилактат, поликапролактон, полиетилен, полигликониева к-на и др.). Към тези биополимери могат да бъдат прибавени растежни фактори (VEGF, IGF-1, bFGF, TGFbeta1 и др.) и високотехнологични материали (наносиликати, графен, титан, карбон и др.), които да подобрят качествата на крайния продукт. Полученото скеле бива комбинирано с автоложна клетъчна култура от прогениторни клетки (мезенхимни прогенитори, фетални фибробласти, iPSC и др.), които могат да бъдат принтирани директно с биополимерите по време на изграждането на модела или да бъдат допълнително инокулирани след завършването му. Инокулираните в модела клетки започват постепенно да разграждат биополимерите му и да ги заместват с произведените от самите тях компоненти на екстрацелуларния матрикс, докато скелето не бъде преобразувано в морфологично и функционално пълноценна тъкан или орган.

Цел на настоящето изследване е приготвянето на хидрогел от алгинат, метилцелулоза и лапонит с оптимални физико-химични качества, които да позволят използването му като материал за биопринтиране по метода на инжекционното екструдирание на имплант с повишена остеогенен потенциал. Ще биопринтираме два варианта на импланта – първия с остеогенни растежни фактори и втория без. Ще ги инокулираме с мултипотентни мезенхимни прогенитори и след *in vitro* инкубация и култивация за различно дълги периоди от време ще приготвим хистологични препарати и ще изследваме за наличието на ново произведени влакна на съединителната тъкан, както и количеството, жизнеспособността и морфологията на клетките, които са мигрирали в него.

Постигнати резултати:

Беше разработена и изследвана комбинация (композит) от два полизахаридни полимера (алгинат и метилцелулоза) и наносиликат (лапонит) като биомастило за 3D печат, базиран на директна екструзия.

При тестовите за 3D печат биоматилото беше в състояние да произведе сложни порести триизмерни матрици (биоскафолди) с отлична точност на размерите, които не се деформират допълнително при втвърдяване.

3D отпечатаните матрици бяха нарязани и монтирани като хистологични препарати и оцветени със стандартни хистологични протоколи. Полизахаридните вериги се визуализират като пореста мрежа, обграждаща взаимосвързани пространства с диаметри в диапазона от по-малко от 100 μm до 500 μm . Лапонитът се визуализира като люспеста субстанция, която се оцветява от основните багрила и създава фонов оцветяване. Частичната екстракция на лапонита чрез фиксиране и промиване намалява фоновото оцветяване. Това би позволило да се разработи протокол за хистологичен и цитологичен анализ на поселени с клетки матрици.

3D матриците бяха сканирани с клиничен СТ-скенер и дентален СВСТ-скенер и получените изображения бяха сравнени с компютър-томографските образи от суха човешка петна кост (calcaneus). Средната плътност в HUs на 3D отпечатаните матрици е близка до естествената кост и може да бъде допълнително модифицирана от концентрацията на лапонита и порьозността на модела, което прави биоматилото подходящ тъканно-еквивалентен материал за изработване и на образни фантоми.

Всички тези качества са необходими за генерирането на сложни мултимодални фантоми, които могат да симулират едновременно биологични и радиологични свойства на трабекуларната костна тъкан (както и на други тъкани) при физиологични и патологични състояния. Такива устройства могат да бъдат безценен инструмент в *in vitro* изследване на костната патология и зависимостта на образните свойства от различни патологични процеси.

Отпечатаните сложни триизмерни матрици, изработени от полизахаридно-наносиликатен хидрогел могат да бъдат допълнително обогатени с различни растежни фактори биоактивни субстанции. Въз основа на проведените експерименти беше разработен хипотетичен модел за биопринтиране на остеогенна матрица. Моделът включва обогатяване на композитния полизахаридно-наносиликатен хидрогел с тромбоцитен лизат и FGF-2, инокулиране с мезенхимни стволови клетки, получени от костен мозък, инкубиране в биореакторна система със среда за клетъчно култивиране и анализ чрез хистологични и цитохимични методи. С тази комбинация от материали и добавки ще се насърчи остеогенната диференциация на MSC, което ще създаде възможност за интегриране на този метод в клиничната практика. Предстои проверка на този хипотетичен модел в *in vitro* условия.