



*Медицински Университет – Плевен
Факултет Медицина
Катедра „Физиология и Патопфизиология ”*

Д-р Армине Вардани Григорян

**ИЗСЛЕДВАНЕ РЕГЕНЕРАЦИЯТА НА КОСТНА ТЪКАН В МОДЕЛ
НА ОСТЕОПОРОЗА С ЕСТРОГЕНЕН ДЕФИЦИТ ПРИ ЖЕНСКИ
ПЪХОВЕ ВИСТАР СЛЕД ИНТРАОСАЛНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА
НОВИ БИОАКТИВНИ ХИБРИДНИ НАНОМАТЕРИАЛИ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „доктор”
Научна специалност: 03.01.05 „Патофизиология”**

Научни ръководители:

**Доц. д-р Анелия А. Димитрова, дм
Проф. Маргарита Д. Апостолова, дб**

Плевен, 2018



Д-р Армине Вардани Григорян е родена в гр. Ереван, Република Армения. Средното си образование завършва в гр. Ереван през 1994г. в СОУ №147 с рускоезиково обучение. Завършва медицина в Ереванския институт по традиционна медицина през 2000г. с отличен успех. Има призната специалност „Патофизиология“. От 2011г. работи като асистент в сектор „Патофизиология“ при МУ-Плевен. Д-р Григорян е член на Българското дружество по физиологични науки и Българския лекарски съюз.

* * *

Дисертационният труд е написан на 131 страници и е онагледен с 11 таблици и 42 фигури.

Библиографската справка включва 214 литературни източника, от които 10 на български език и 204 на английски.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „Физиология и Патофизиология“ при Медицински университет – Плевен.

Публична защита на дисертационния труд ще се състои на открито заседание на Научното жури на 03.07.2018 г. от 14.00 ч. в залата 102 на Факултета по фармация МУ-Плевен.

Материалите по защитата са на разположение в Научния отдел и са публикувани на интернет страницата на МУ-Плевен.

БЛАГОДАРНОСТИ

Искам да изкажа искрена и дълбока благодарност на научните мениджъри доц. д-р Анелия Димитрова, дм и проф. Маргарита Апостолова, дб за изключителната и непрекъснатата подкрепа, съдействие, както и високия професионализъм, с който ми помагаша през всички етапи на работния процес.

Изключително съм признателна на д-р Татяна Бетова за напътствията, оказаната подкрепа и ценните професионални съвети при осъществяване на хистологичното изследване и за възможността винаги да разчитам на компетентното ѝ мнение и оценка.

Издавам своята благодарност на:

- Доц. М. Атанасова, дб, гл. и гл.ас. А. Блажев, както и на целия колектив на сектор „Биология“ за съдействието и помощта при извършването на имунологичните изследвания.
- Доц. д-р А. Русева, дм, р-л МДКЛ при УМБАЛ-Плевен, където бяха направени клинично-лабораторните изследвания.
- гл. ас. д-р К. Костов, дм за ценните съвети, помощта и съдействието през всички етапи на работния процес, както и на целия колектив на сектор „Патофизиология“, МУ-Плевен за помощта и подкрепа.
- д-р Гергана Тотева, завеждащ вивариум - МУ-Плевен, за непосредственото ѝ участие при извършване на експериментите и контрола при отглеждането на животните.
- На МУ-Плевен за предоставените средства по проекти: №-12/2014 г., №-5/2016г. и BG05M2OP001-2.009-0031-C01.

Благодарна съм за огромна подкрепа и разбиране на моето семейство!

СЪКРАЩЕНИЯ

Кирилица

Ок	Остеокласти
Об	Остеобласти
Оц	Остеоцити
ЕЦМ	Екстрацелуларен матрикс
ИХХ	Имунохистохимия
КМП	Костна минерална плътност
СЗО	Световна здравна организация
ХОББ	Хронична обструктивна белодробна Болест

Латиница

Ca	Калций
P	Фосфор
Mg	Магнезий
OVX	Овариектомия
COL-1	Колаген тип I
OA	Остеоартрит
RA	Ревматоиден артрит
SD	Стандартни отклонения
ND	Нанодиаменти
OCN	Остеокалцин
SPARC	Остеонектин
ALP	Алкална фосфатаза
MMPs	Матриксни метолопротеинази
TIMPs	Тъканни инхибитори на MMPs
TGF- β	Трансформиращ растежен фактор- β
IGF	Инсулин-подобен растежен фактор
TNF	Тумор некротизиращ фактор
OPN	Остеопонтин
IL	Интерлевкин
IFN	Интерферон
Pg-E ₂	Простагландин - E ₂
PTH	Паратиреоиден хормон
Ers	Естрогенни рецептори
FSH	Фоликулостимулираща хормон
FGF	Фибробластен растежен фактор

BMSCs	Стромални клетки на костен мозък
M-CSF	Макрофаг-колония стимулиращ фактор
RANKL	Рецепторния активатор на нуклеарния фактор капа - В лиганд
RANK	Лиганд на RANKL
OPG	Остеопротегерин-остеокластогенезен инхибиращ фактор
GAG	Гликоаминогликани
PDGF	Тромбоцитен растежен фактор
GM-CSF	Гранулоцит-макрофаг-колония-стимулиращ фактор
VEGF	Съдов ендотелен растежен фактор
ADAM , ADAMTS	Семейства на металоендопептидази
t-PA/ u-PA	Тъканен / урокиназен плазминогенен активатор
FDA	Агенцията за контрол на храните и лекарствата в САЩ

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
II.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	10
III.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	11
	1. Експериментален протокол.....	11
	1.1. Опитни животни.....	11
	1.2. Адаптиране на модел за остеопороза.....	11
	2. Получаване на 3D биоактивни инжекционни хибридни наноматериали.....	12
	3. Предклинични изследвания на тъканната съвместимост на новите наноструктурирани материали.....	13
	4. Методи за проследяване на развитието на остеопорозата.....	14
	5. Вземане на биологичен материал за клинично-лабораторно и имунологично изследване.....	16
	5.1. Вземане на кръв.....	16
	5.2. Имунологично изследване.....	16
	6. Статистически методи.....	17
IV.	РЕЗУЛТАТИ.....	18
V.	ОБСЪЖДАНЕ.....	44
VI.	ИЗВОДИ.....	62
VII.	ПРИНОСИ.....	64
VIII.	СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ.....	65
IX.	СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ СЪОБЩЕНИЯ.....	66
X.	УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ ФИНАНСИРАНИ ОТ МУ ПЛЕВЕН.....	68

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Остеопорозата е едно от социално значимите заболявания на 21-я век. Повишената честота на фрактурите на бедрената шийка, прешлените и предмишницата съчетани с остеопороза са сред главните здравословни проблеми на съвременното общество. Остеопорозата е заболяване, при което се намалява минералната плътност на костта, разрушава се нейната микроархитектура и се променя експресионния профил на протеините. Това предразполага костите към счупване, което в повечето от случаите води до инвалидност.

Литературните данни сочат, че остеопороза засяга над 200 милиона жени по света (Constâncio С. и съавт., 2017). Болестта е значително разпространена в Европа, водеща до над три милиона фрактури годишно, като в България всяка година се регистрират над 90000 счупвания. Броят на счупванията предизвикани от остеопороза може да нарасне значително през следващите десетилетия, поради удължаване на продължителността на живот в Европа. Изчислените средни годишни разходи за лечение на пациенти, страдащи от такива проблеми в ЕС се очаква да се увеличи от 37,4 млрд. евро през 2010 г. до 46,8 млрд. евро до 2025 г., а в САЩ - от 17 млрд. долара през 2005 г. до 25,3 млрд. долара до 2025 г. От друга страна при пациентите над 75 годишна възраст счупванията на бедрото водят до 40% смъртност, като 10-20% от тях загиват в първата година след травмата. Те се нуждаят от непрекъснати грижи, тъй като не могат да водят самостоятелен живот, а една трета от тях не се възвръщат към предишния начин на живот. Поради тази причина е необходимо да се обърне особено внимание на този здравословен проблем, който нарушава качеството на живота на съвременния човек.

Постменопаузалната остеопороза е заболяване със сложна патогенеза. Тя е резултат от ендокринен дисбаланс отключващ различни системни и локални патологични процеси, които индуцират остеокластната активност. Последни проучвания показват, че в патогенезата на остеопорозата важна роля играят матриксните металлопротеинази. Те модулират матриксното ремоделиране на костта чрез повлияване на остеобластната и остеокластната функции. Нарушеният контрол отключва порочен самоподдържащ механизъм, водещ до постоянна свърхекспресия на определени MMPs с висок афинитет към колаген тип-I. Проследяването на ензимната активност в серума и в костната тъкан е от значение за избора на диагностични и терапевтични стратегии.

Медикаментите подобряващи костното ремоделиране, оказват протектиращо влияние за възникването на нови фрактури, но са малко ефективни след появата на такива. Повечето от настоящите анти-остеопорозни лекарства се прилагат орално или парентерално, но понякога поради ограниченото кръвоснабдяване, тези медикаменти не винаги могат да окажат своя положителен ефект. Също така болните често имат тежки съпътстващи заболявания на сърдечносъдовата система, централната нервна система, диабет и гастроинтестинални нарушения, което може допълнително да затрудни изборът на медикамент за лечението.

Днес много често се прибегва към оперативното лечение на фрактурите, което много бързо води до възстановяване на пациентите. Целта е пациентът да бъде изправен на крака възможно най-бързо и да се избегне залежаването. В идеалния случай операцията е до 24 часа, а на следващия ден пациентите се раздвижват. Според специалистите, минималния престой на пациентите в болничното заведение допринася за бързото им връщане към нормалния ритъм на живот. При болните с остеопорозата прогнозите не са оптимистични и решението за извършване на вътрешна фиксация е свързано с лоша прогноза. Ортопедите са

поставени пред избор да откажат интервенция или да поемат високия риск от усложнения, които се дължат на недостатъчна стабилност на фиксацията и лошо качество на остеопоротичната кост.

Решение на проблема в този случай би било използването на специално покритие върху имплантите, което би засилило регенераторните способности на костта.

Използването на наноматериали, като потенциален метод за лечение при остеопороза е нов метод, който активно се проучва от различни научно-изследователски екипи. Изследванията показват, че различните нанопокрития на имплантите ускоряват регенераторните способности на костна тъкан. Поради тази причина изследвания са насочени към разработката на ефективни нанокompозити, които самостоятелно или в комбинация с остеопротективни медикаменти, при локално използване биха подобрили регенераторните функции на костта.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Изследване на регенерацията на костната тъкан при животински модел на остеопорозата у женски плъхове Вистар в репродуктивна възраст след приложение на биоактивни хибридни наноматериали.

ЗАДАЧИ

1. Адаптиране на модел на остеопороза по методиката на (Kharode Y.P. и съавт., 2008) и проследяване кинетиката на развитие.
2. Интраосално инжектиране на биоактивни хибридни наноматериали и проследяване на кинетиката на регенерацията на костта.
3. Определяне на серумните нива на калций, фосфор, магнезий и алкална фосфатаза в експерименталните групи животни.
4. Определяне на серумните концентрации на MMP-9, MMP-13 и TIMP-1 чрез ELISA метод в експерименталните групи животни.
5. Определяне на матриксните металопротеинази (MMP-9, MMP-13), компоненти на костния матрикс - остеонектин (SPARC), и колаген тип I (COL-1), чрез ИХХ метод в костна тъкан.
6. Хистологично и хистохимично изследване на костната тъкан от животни с и без остеопороза.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Преди стартиране на експеримента беше получено разрешение на Комисията по етика за използване на женски бели плъхове порода Вистар в опити. Разрешението е вписано в регистъра на БАБХ за използване на опитни животни с регистрационен № 100 и е валидно до 22.05.2019 г.

1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ПРОТОКОЛ

1.1. Опитни животни

Изследвахме 70 женски плъха, порода Вистар на възраст два месеца при започване на експериментите с начално тегло 150 ± 20 грама.

Всички плъхове бяха отглеждани по стандартен начин в съответствие с „Правилника за работа с лабораторни животни“ приет от МУ-Плевен. Животните бяха подготвени за експериментите чрез аклиматизиране към условията в продължение на една седмица преди започване. Те бяха настанени в стая с контролирани условия (относителна влажност на въздуха 45-65%), 12-часов цикъл светло/тъмно и температура $22 \pm 2^\circ \text{C}$, и с непрекъснат достъп до храна и вода. Всички животни бяха претеглени в началото и в края на експеримента.

1.2. Адаптиране на модел за остеопороза

Аклиматизираните плъхове бяха разделени на случаен принцип в съответните групи: с лъжлива-операция (20 бр.) и с овариектомията (50 бр.).

Извършване на овариектомията: Овариектомията беше извършена при пълна анестезия с използване комбинация от кетамин (90 mg/kg) и ксилазин (10 mg/kg) приложена интраперитонеално, по методика на (Kharode Y.P. и съавт., 2008).

След период от около 2 месеца овариектомираните животни бяха разделени отново на случаен принцип в три групи, третирани по различни начини, които са представени в **Таблица 1**.

Таблица 1. *Експериментални групи животни.*

ВИД	ВЪЗРАСТ	БРОЙ	ГРУПА	МАНИПУЛАЦИЯ	ДОП. ТРЕТИРАНЕ
WISTAR	4 месеца	15	Г-I	Овариектомирани (OVX)	Третирани с полимерни матрици (PLGA-PEG-PLGA)
WISTAR	4 месеца	15	Г-II	Овариектомирани (OVX)	Третирани с полимерни матрици и нанодиаменти (PLGA-PEG-PLGA-ND)
WISTAR	4 месеца	20	Г-III	Овариектомирани (OVX)	
WISTAR	4 месеца	20	Г-IV	Контролна (SHAM)	

2. ПОЛУЧАВАНЕ НА 3D БИОАКТИВНИ ИНЖЕКЦИОННИ ХИБРИДНИ НАНОМАТЕРИАЛИ

В ИМБ-БАН съвместно с МУ-Плевен, бяха синтезирани и предоставени за предклинично проучване 3D наноструктурирани „интелигентни“ полимерни хибридни материали с различни свойства и състав. Изследванията бяха осъществени по Договор ДО-1-1126/2007 с Фонд “Научни изследвания”- програма Нанотехнологии към МОН.

Методология

Бяха синтезирани серии от три-блокови съполимери на основата на полиетиленгликол (PEG), полимлечна (PL) и полигликолова (GA) киселина с различна дължина на PLGA блоковете и LA-GA съотношение, съдържащи биологично активните вещества и наночастици. Синтезът на блоковите съполимери с обща структура PLGA-PEG-PLGA е детайлно описан в (Kolev I. и съавт., 2012). За биологични изследвания използвахме

25 % (w/v) PLGA1000-PEG1000-PLGA1000 и PLGA900-PEG1000-PLGA900, съдържащи 0.5 mg/ml нанодиаменти.

➤ *Пирогенно изследване*

Пирогенното изследване на нови материали е ключов компонент за определяне на това, дали те са безопасни за употреба от животните и човека. Получените наноразмерни частици и инжекционни хибридни наноматериали бяха изследвани съгласно ISO 29701:2010, представляващо провеждане на ендотоксинов тест, използвайки *Limulus amoebocyte lysate*. Експериментът беше проведен с комерсиализиран тест (PyroGene, Lonza), който е FDA лицензиран.

➤ *Оценка на инжекционните свойства*

Възможността за инжектиране на наноструктурирани хибридни материали, беше измерена с цел определяне на оптимално състояние на инжектиране. За експериментите бяха подготвени игли (с различен вътрешен диаметър), които се използват при интраосални инжекции на бебета. Те бяха заредени в спринцовки. Спринцовките бяха монтирани в устройството и поставени под натиска на универсална машина за изпитание, при скорост на натиск от 1 мм/мин. Силата на натиск беше записвана по време на компресирането на хибридните материали и плотирана спрямо дължината на преместването на буталото.

3. ПРЕДКЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ТЪКАННАТА СЪВМЕСТИМОСТ НА НОВИТЕ НАНОСТРУКТУРИРАНИ МАТЕРИАЛИ

Изследване на тъканния отговор и проследяване процесите на възпаление, имунологични реакции и костна регенерация. За тази цел един милилитър от приготвените разтвори на полимери в следните комбинации PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ (**Група 1**) и PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ + NDs (**Група 2**) бяха подкожно инжектирани на плъхове порода

Вистар за проследяване на биосъвместимостта, деградируемостта и имунологичният отговор.

4. МЕТОДИ ЗА ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА РАЗВИТИЕТО НА ОСТЕОПОРОЗАТА

4.1. Система за *in vivo* сканиране на животните в близката ИЧ област за регистриране на промените, настъпващи в костите (*Odyssey scanning system, Li-COR*)

Използван беше маркер (Bonetag Optical Probe, Li-COR), белязан с флуоресцентно багрило емитиращо в инфрачервения спектър (IRDye® 800CW или IRDye 680, Li-COR) след свързване с Са в костите.

Принцип на метода: Са-хелиращи съединения (тетрациклин, ализарин и калцеин) ефективно се използват за регистрация на костната минерализация, растеж, и морфологични промени. Тези съединения съдържат имино диацетатни кисели групи, които формират хелатен комплекс с Са в костите след инжектиране. Маркерът е нетоксичен, флуоресцентен и лесно биоразградим. Той дава възможност за оценката на остеопорозата в кинетика, посредством сканиране на експерименталните групи животните под анестезия.

4.2. Метод за измерване на нанотвърдостта

Експлантираните феморални кости от моделните животни, бяха подложени на нанонатиск (Nano-indentation) с помощта на Compact Platform CPX (МНТ/ННТ), в Централната лаборатория по приложна физика (БАН). Създадена бе методика за измерване на нанотвърдостта, определяне на еластичен модул на костната тъкан и дълбочината на проникване. Методиката включва 9 отделни измервания върху 3 зони на бедрената кост.

4.3. Хистологично и хистохимично изследване на бедрена кост

Морфологичните изследвания са извършени в Катедра „Патологоанатомия“ при МУ-Плевен и Лаборатория по медикобиологични изследвания (ИМБ-БАН, София).

За целта бяха използвани свежи препарати от експлантирана лява бедрена кост на всички групи животни, с топка проксимален (горен) фрагмент на фемура (*femur, os femoris*).

Всяка проба бе подложена на изследване с :

- Рутинен хистологичен метод (HE)
- Хистохимичен метод за оценка на колаген в основната костна субстанция (оцветяване по Ван Гизон)
- Имунохистохимично оцветяване за остеонектин (SPARC), колаген тип I (COL-1), MMP-9 и MMP-13.

Методология

От всеки плъх беше внимателно отпрепарирани и експлантирана лява бедрена кост и фиксирана в 10% буфериран (pH=7) формалин. След фиксацията материалите бяха измити под течаща вода, подсушени и фрагментирани с ножовка. Всеки тъканен фрагмент бе поставен в номерирана касета и потопен в слаб декалциниращ разтвор за хистология „OSTEOSOFT“ за 24-48 ч. до извличане на калция. След което тъканните проби се дехидратираща чрез поставане за определено време последователно в отделни съдове с етилов алкохол с повишаващи се концентрации. След извличане на водата се извърши просветляване и инпрегниране на тъканите в парафинови блокчета. От всяко парафиново блокче тъканите се режеха на последователни срезове с дебелина 3 µm.

Количествена оценка на експресията на MMPs и TIMP-1

Интензивността на имунохистохимичното оцветяване се определяше полуколичествено и се оценяваше по следната скала: 0 – липсва

оцветяване; 1 – слабо; 2 – умерено; 3 – силно. За статистическата обработка е използван непараметричен тест - Mann Whitney (W) при сравняване на медианни стойности.

5. ВЗЕМАНЕ НА БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ ЗА КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНО И ИМУНОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

5.1. Вземане на кръв

В края на експеримента беше взета кръв от 70 експериментални животни в стерилни вакутейнери за серум, без антикоагулант чрез пунктиране на абдоминалната аорта под лека етерна наркоза. Кръвта беше центрофугирана на 1500 об/мин и разпределена по групи, според количество необходимо за планираните изследвания. Част от серумите, още същия ден, бяха изпратени в централна клинична лаборатория при “УМБАЛ - д-р Георги Странски” ЕАД Плевен за изследване на лабораторни показатели. Останалата част от серумите бяха замразени при температура - 80°C в университетската лаборатория за научно-изследователска дейност при МУ-Плевен, до момента на осъществяване на имунологично изследване. Лабораторните показатели - Ca, P, Mg и ALP бяха изследвани веднага.

5.2. Имунологично изследване

Серумните нива на MMP-9, MMP-13 и TIMP-1 бяха определени с помощта на имунологичен метод ELISA в к-ра „Анатомия, хистология, цитология и биология“, Сектор „Биология“ - МУ Плевен.

Концентрациите на MMP-9, MMP-13 и TIMP-1 за всеки тестиран серум се изчисли по формула, получена от стандартна права, която е построена въз основа на екстинкциите на стандартите при различни концентрации.

6. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

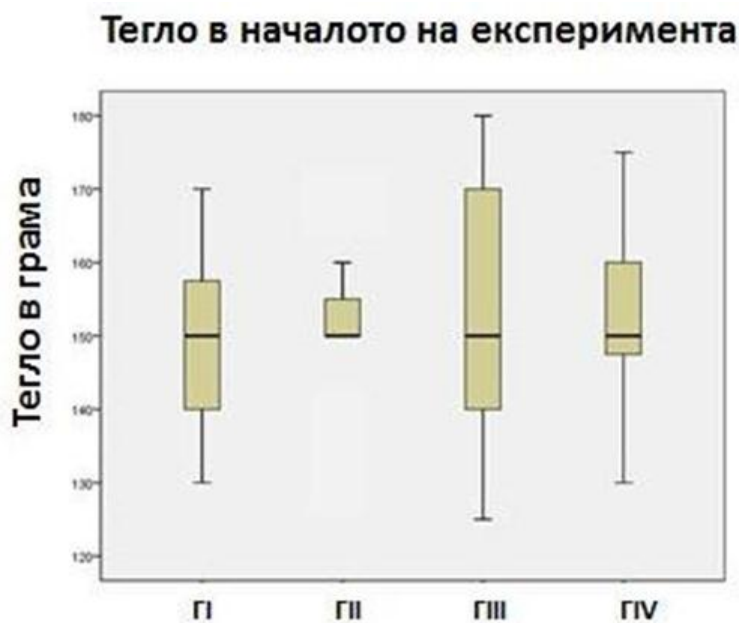
За анализите е използван статистическият пакет SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, USA). Данните от проучването са описани чрез таблици, графики и числови величини за относителен дял - средни стойности (\bar{X})/медиана \pm стандартно отклонение (SD). За изводи и заключения при сравняване на две средни „несвързани“ проби са използвани параметрични тестове, изискващи нормално или близко до нормалното разпределение - T-test. При сравняване на повече от две средни за изучаване влиянието на различни фактори – ANOVA с последващ тест на Бонферони. При различно от нормалното разпределение е използван непараметричен тест - Mann Whitney (W) при сравняване на медианни стойности. За установяване на взаимовръзки е използван корелационен коефициент (rS) на Спирман за отчитане на рангова корелация. Степента на корелациите е оценена според корелационния коефициент (r) при 5-степенна скала, като: слаба ($0 < r < 0,3$), умерена ($0,3 < r < 0,5$), значителна ($0,5 < r < 0,7$), висока ($0,7 < r < 0,9$) и много висока ($0,9 < r < 1$). За всички тестове е възприето ниво на значимост $p < 0.05$.

IV РЕЗУЛТАТИ

I. РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТЕГЛОТО

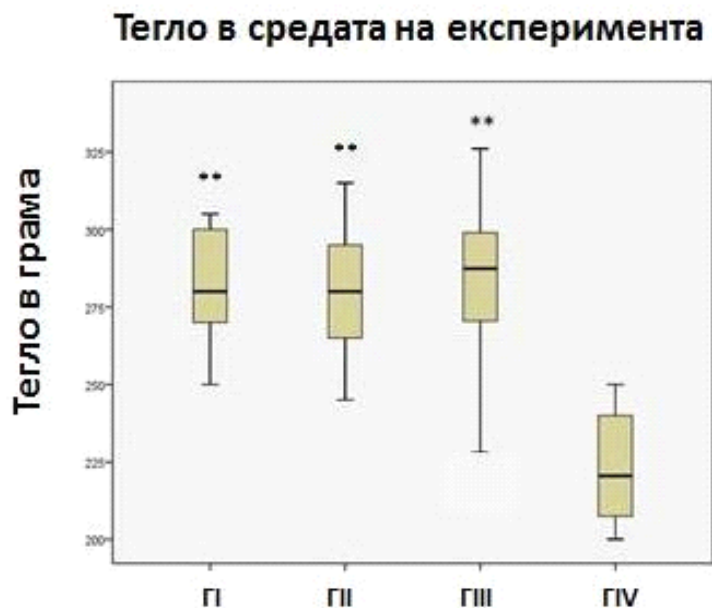
Изследвахме 70 плъха порода Вистар на възраст два месеца. Изходното тегло на животните беше 150 ± 20 гр. Животните бяха разпределени на случаен принцип по 5 в клетка (**Таблица 1**).

1.1. Резултати от изследването показаха, че в началото на експеримента между теглото на четирите групи животни няма достоверна разлика ($p=0.938$) (**Фигура 1**).



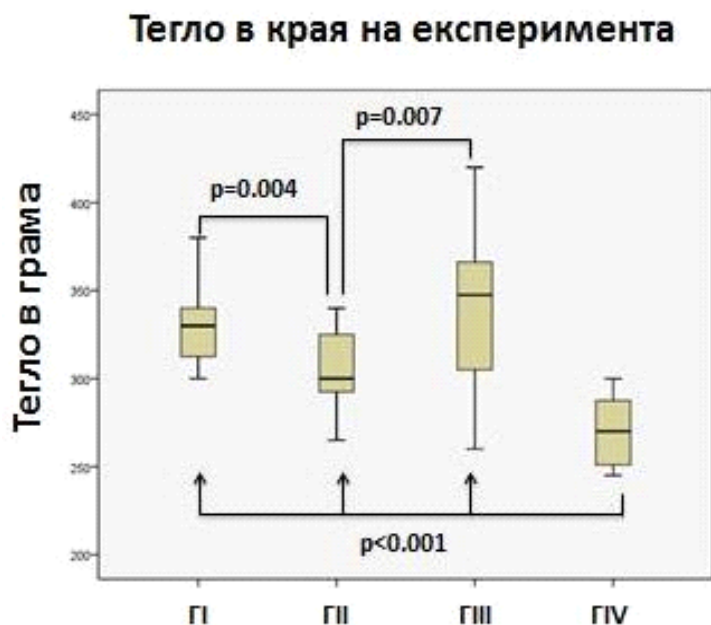
Фигура 1. Сравняване на теглото в групите - Г I, Г II, Г III и Г IV. Резултатите показват липса на статистически достоверни разлики. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение.

1.2. В края на двумесечния период се установи достоверна разлика в теглото. Резултатите от изследването показаха, че теглото на животните в Г I ($282,33\pm 17,71$) гр., Г II ($280,67\pm 21,03$) гр. и Г III ($280,76\pm 27,30$) гр. беше достоверно повишено спрямо това в Г IV ($223,55\pm 16,49$) гр., (** $p<0.001$) (**Фигура 2**).



Фигура 2. Статистически достоверни разлики на теглото в групите GI, GII, GIII и GIV в средата на експеримента. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение (** $p < 0.001$ спрямо група GIV).

1.3. След третирането на част от OVX животни с полимерни матрици се наблюдаваха следните промени в теглото: Групи GI ($330,00 \pm 22,52$) гр., GII ($304,67 \pm 22,15$) гр., GIII ($336,32 \pm 41,72$) гр. и GIV ($270,35 \pm 18,27$) гр. Съществува достоверна разлика между теглото в GI, GII и GIII спрямо това в група GIV (** $p < 0.001$). Теглото на животните в GIII също беше сигнификантно повишено спрямо това в GII, като съществува достоверна разлика между двете групи, $p = 0.007$. Теглото на животните в GI беше сигнификантно повишено спрямо това в GII, като отново беше намерена достоверна разлика между двете групи $p = 0.004$ (Фигура 3).

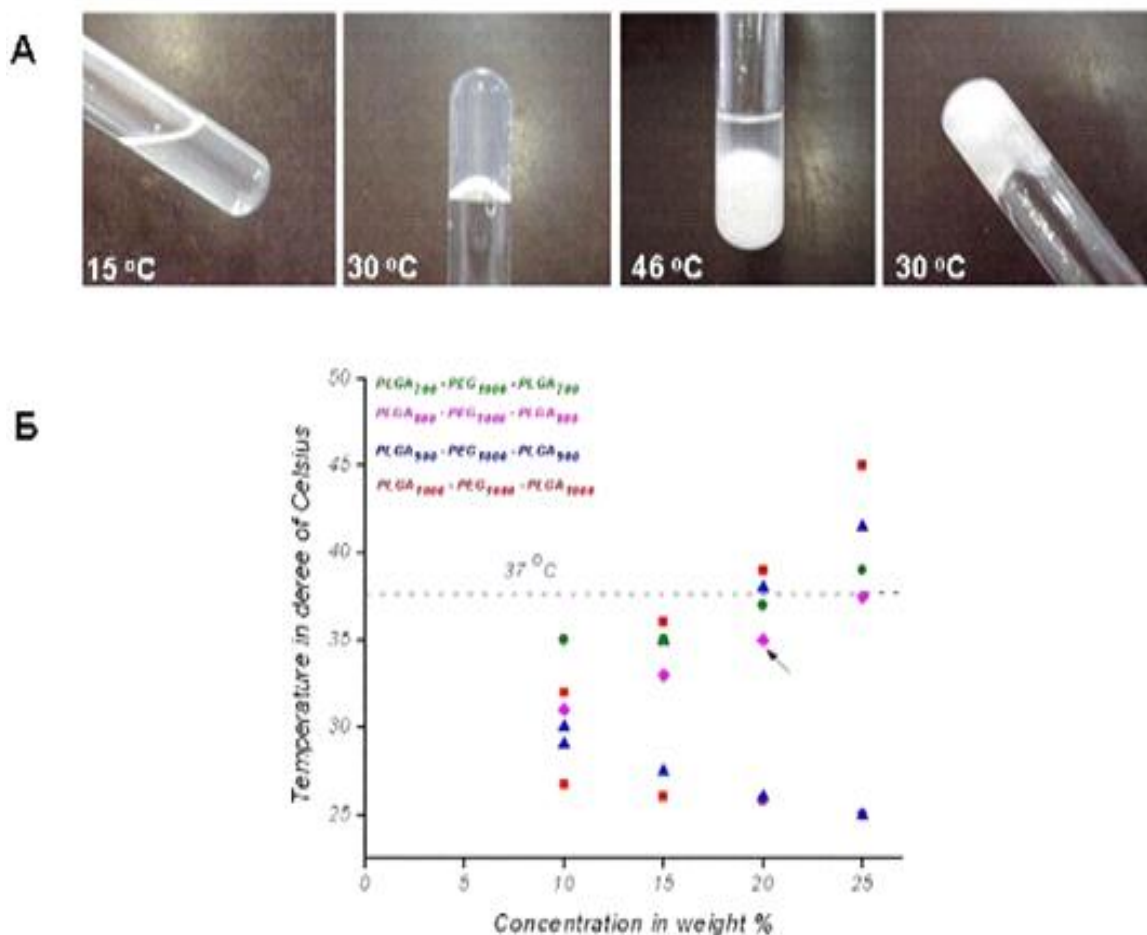


Фигура 3. Достовърни разлики на теглото в групите GI, GII, GIII и GIV в края на експеримента. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение.

II. ПОЛУЧАВАНЕ И ТЕСТВАНЕ НА 3D БИОАКТИВНИ ИНЖЕКЦИОННИ ХИБРИДНИ НАНОМАТЕРИАЛИ

Бяха извършени фазови преходи (разтвор-гел) на водни разтвори от PLGA-PEG-PLGA триблокови съполимери (с концентрации 10, 15, 20 и 25 масови %), за определяне на промени в тяхната консистенция и вискозитет, в отговор на температурни изменения. Анализът беше извършен с помощта на „tilting method”. Фазовото „поведение” (обратим течен-гел-течен фазов преход) на получените блокови съполимери във водна среда като функция от температурата на средата и полимерната концентрация е представено на **Фигура 4** (А и Б).

При тестване на четири варианта на съполимери се установи, че само PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ и PLGA₉₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₉₀₀ съполимери притежават типичния, за този тип полимери, фазов преход - течност-гел.



Фигура 4. Фазов преход на разтвор на три-блоков $PLGA_{1000}-PEG_{1000}-PLGA_{1000}$ съполимер (А) и фазова диаграма за посочените $PLGA-PEG-PLGA$ съполимери (Б).

За разлика от тях обаче, останалите два блокови съполимера ($PLGA_{800}-PEG_{1000}-PLGA_{800}$ и $PLGA_{700}-PEG_{1000}-PLGA_{700}$) показаха значителни разлики във фазовото поведение. Причината за наблюдаваните различия може да е следствие от разликите в дължините на PLGA блоковете в синтезираните съполимери. PLGA веригите предизвикват значително по-силно хидрофобно взаимодействие, водещо и до увеличение в агрегационната, „пакетираща“ тенденция между отделните полимерни мицели и формиране на „по-плътна“, стабилна гел фаза, каквато са наблюдава при състав $PLGA_{1000}-PEG_{1000}-PLGA_{1000}$ и $PLGA_{900}-PEG_{1000}-PLGA_{900}$. Гел зона във фазовата диаграма на $PLGA_{800}-PEG_{1000}-PLGA_{800}$ и $PLGA_{700}-PEG_{1000}-$

PLGA₇₀₀ съполимери не бе регистрирана. Бяха отчетени значителни изменения във вискозитета и цвета на изследваните разтвори – промени от по-силно вискозно състояние с амбър цвят до по-малко вискозно състояние с бял цвят. Допълнително повишаване на температурата доведе до спонтанен преход от слабо вискозната течност до утайка. Необходимо е да се отбележи, че посочените промени във фазовите състояния (гел-суспензия) са в отговор на настъпилите температурни промени т.е. увеличение на температурно движение на хидрофобните блокове, което е отразено и в намаление на стабилността на полимерните хидрогелове. *Доказано беше, че 20 и 25% водни разтвори на съполимерите се превръщат в гелове при температура близка до 37 °C и поради тази причина PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ бе избран като матрица за последващи експерименти.*

III. ТЪКАННАТА СЪВМЕСТИМОСТ НА НОВИТЕ НАНОСТРУКТУРИРАНИ МАТЕРИАЛИ

Резултатите от проведените изследвания на 15 ден показаха добра биосъвместимост, разградимост и липса на възпалителни реакции и са обобщени в **Таблица 2**.

Както може да се види от **Таблица 2**, част от импланта все още е наличен на 15 ден (сини кръгове). Процентът на разграждане е средно 70% и заедно с наблюденията за липса на възпалителни реакции и липса на възпаление, показва добрата биосъвместимост. Това ни даде основание да приложим създадените в БАН полимерни матрици върху експериментален модел на остеопороза при плъхове.

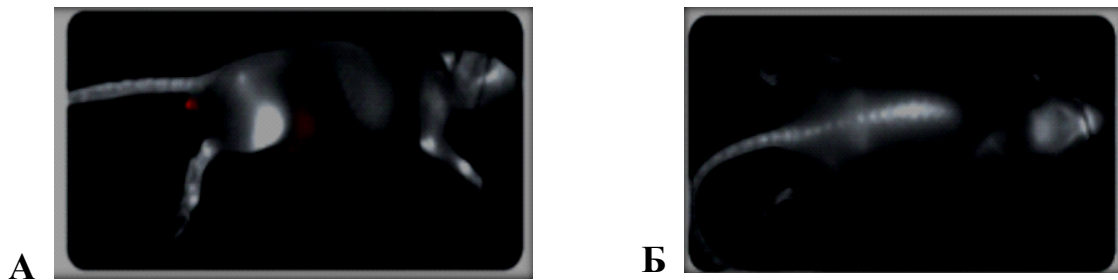
Таблица 2. *Резултати след подкожно приложение на имплантите.*

Визуализация подкожни импланти	Брой изследвани животни	Разграждане на импланта (wt %) Ден 15	Възпаление	Засилено кръвоснабдяване
	5	80	Не	Не
	3	78	Не	Да

IV. ДАННИ ЗА ОСТЕОПОРОЗА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИТЕ ГРУПИ ЖИВОТНИ

4.1. In vivo сканиране на животни

Проследяването на развитието на остеопороза след овариектомията на животните се извърши под анестезия, след въвеждането на маркер (IRDye® 800CW Li-COR). Маркерът се метаболизира и екскретира чрез жлъчката и бъбреците. Тази оптична сонда (маркер) излъчва в близката инфрачервена част на спектъра и представлява калциев хелатиращ визуализиращ агент, който се свързва с калция в костите и служи за визуализиране на костните структури. Животните бяха сканирани 3 пъти, в началото, по време на, и в края на експеримента. В началото на експеримента здравата кост поема максимално количество от сондата и показва интензивна флуоресценция в скелета, което е демонстрирано на **Фигура 5.**



Фигура 5. Сканирано животно в началото на експеримента. А: Странично положение; Б: По-гръб.

След извършената овариектомията при сканирането на животните ние регистрирахме следните промени:

- Феморалната кост на OVX животните отрази слабо излъчване на маркера, което говори за нарушената минерализация в дадената област.
- При сканирането на животните от SHAM групата не бяха отчетени промени (**Фигура 6**).

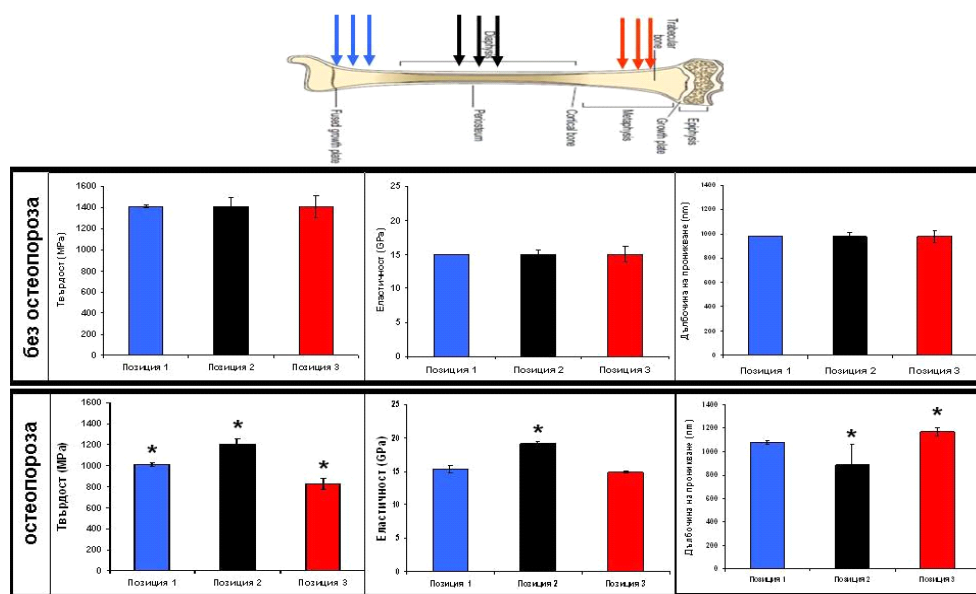


Фигура 6. Представителни резултати от сканирането на две групи животни „sham” оперирани и „ovx” – овариектомирани.

Фигура 6 демонстрира разликата в интензитета на флуоресценцията в костите, респективно натрупания калций между животните от група ГIV (SHAM) сравнени с животните от групата ГIII (OVX). Този резултат потвърждава успешното създаване на модел на остеопороза във Вистар плъховете.

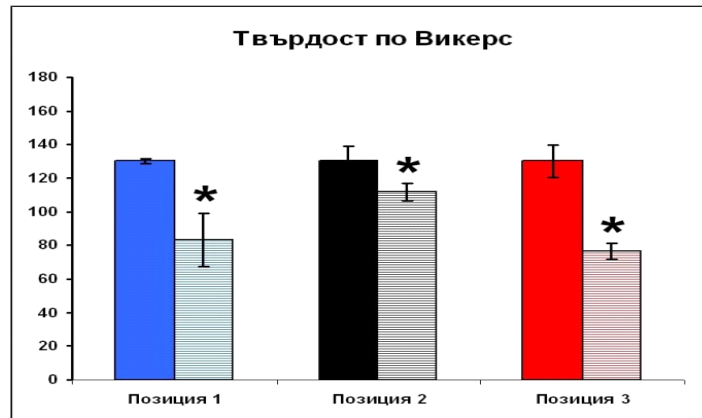
4.2. Потвърждаване на остеопорозата, чрез нанонатиск

Развитието на остеопорозата беше потвърдено и след завършването на експеримента с помощта на експлантиране на феморалните кости от моделните животни, които бяха подложени на нанонатиск. Бяха наблюдавани достоверни разлики ($p < 0.05$) между „лъжливо” оперираните животни и тези с остеопороза и при трите измервани показатели – твърдост (MPa), еластичност (GPa) и дълбочина на проникване (nm), чрез извършени 9 отделни измервания обозначени със стрелки на **Фигура 7**.



Фигура 7. Резултати от нанонатиск (20 mN) върху експлантирани феморални кости в посочените области (n=15).

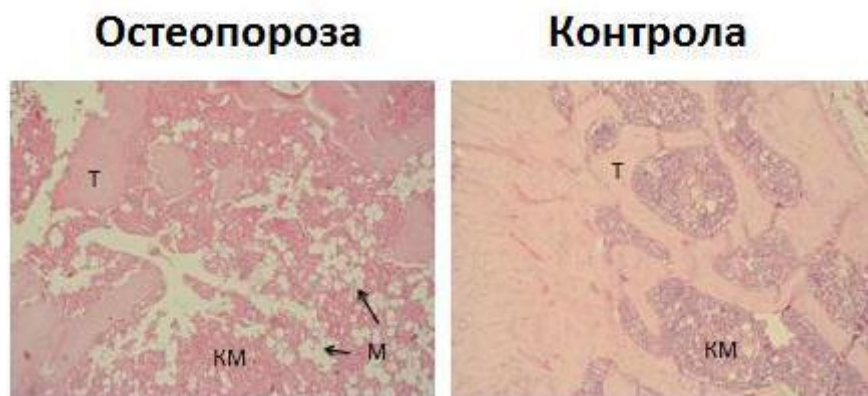
Животните развили остеопороза, притежават по-малка твърдост на феморалната кост, измерена и в 3те посочени със стрелки региони. Наблюдава се по-голяма еластичност на костта в областта на диафизата (черни стрелки) и се регистрира по-голяма дълбочина на проникване в епифизния участък (червени стрелки). Особено показателни са данните при определяне на твърдостта по Викерс (**Фигура 8**), където ясно се визуализират статистически достоверните разлики в 3те участъци, върху които се провежда изследването.



Фигура 8. Твърдост по Викерс. Определена в обозначените позиции както на Фигура 7. Контроли (плътно оцветени) и животни с остеопороза (цтрих). Натиск 20 mN.* достоверна разлика спрямо контролите, $p < 0.05$, $n = 15$.

4.3. Хистологични изследвания

Успешното развитие на модела за остеопороза беше потвърдено и с помощта на хистологични изследвания. Един месец след оперативно провеждане на овариектомията феморалните кости бяха експлантирани, фиксирани в 10% формалин, декалцифицирани и оцветени с хематоксилин/еозин. Резултатите са показани на **Фигура 9**.



Фигура 9. Препарати от феморалната кост, оцветени с хематоксилин-еозин. Ув. $\times 100$.

При животните с остеопороза се наблюдава: изтъняване на костните трабекули (Т) и нарушаване на връзката по между им (стрелки), редукция

на костната маса и увеличаване на остеокластната активност, редуцирано количество на костен мозък (КМ) и увеличаване броя на мастните клетки в него (М).

Получените експериментални данни доказаха, че приложеният от нас модел за развитие на остеопороза в използваните плъхове е успешен, което ни позволи да преминем към проучване влиянието на създадените от нас композитни инжекционни наноматериали върху регенерирането на костната тъкан.

Плъховете развили остеопороза бяха инжектирани итраосално с PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀, съдържащ 25 (wt %) нанодиаманнти и проследени за костна регенерация за период от 1 месец.

4.4. *In vivo* сканиране на животни след прилагането на композитните материали, съдържащи нанодиаманнти

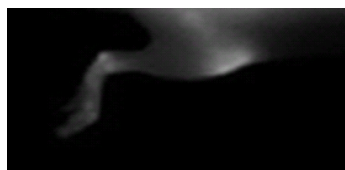
В края на експеримента след приложеното третиране, при сканирането на животните ние регистрирахме следните промени:

- Феморалната кост, при животните третирани с композитни материали, съдържащи нанодиаманнти се доближава до здравата кост, по интензитета на излъчването, което говори за добра минерализация и регенерация на костната структура (**Фигура 10**).

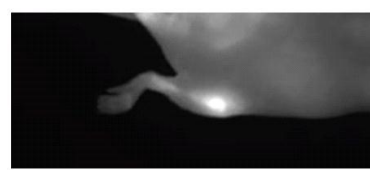
*Здрав плъх № 7, преди
началото на
експеримента*



*Плъх № 7, развил
остеопороза*



*Плъх № 7, третиран
интраосално с
нанокомпозит*



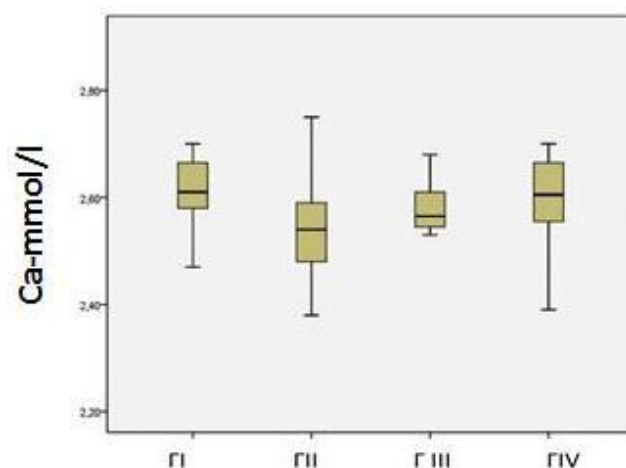
Фигура 10. Разликата в интензитета на флуоресценцията в един плъх проследен за изследвания период.

V. РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЕРУМНИТЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НА КАЛЦИЙ, ФОСФОР, МАГНЕЗИЙ И АЛКАЛНА ФОСФАТАЗА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИТЕ ГРУПИ

Серумните показатели калций, магнезий, фосфор и алкална фосфатаза бяха определени с помощта на рутинни лабораторни тестове в края на експеримента.

5.1. Резултати от определяне на серумния калций

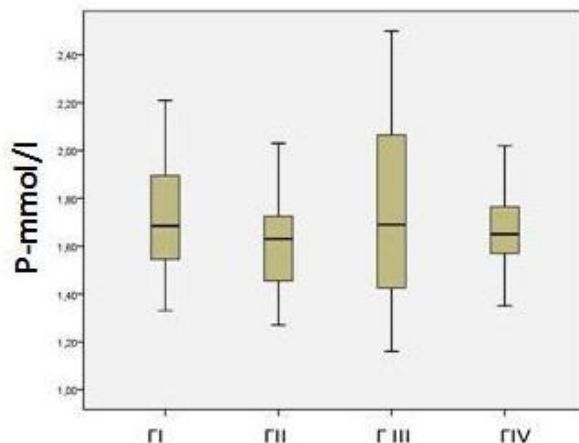
Резултатите показаха, че не съществуват достоверни разлики в серумните концентрации на калций между експериментални групи животни: Г I ($2,60 \pm 0,08$) mmol/l, Г II ($2,55 \pm 0,13$) mmol/l, Г III ($2,58 \pm 0,05$) mmol/l, Г IV ($2,58 \pm 0,11$) mmol/l (**Фигура 11**).



Фигура 11. Сравнение на серумните концентрации на калций в Г I, Г II, Г III и Г IV. Липсват достоверни разлики между групите. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение в mmol/l, $n=70$.

5.2. Резултати от определяне на серумния фосфор

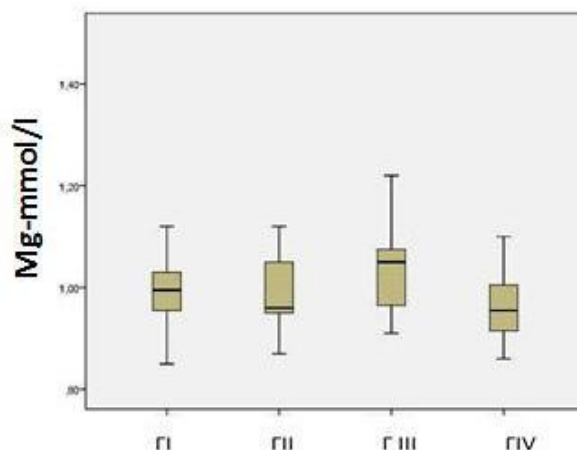
Резултатите от изследването показаха, че не съществуват статистически значими разлики в серумните концентрации на фосфор между експериментални групи животни: Г I ($1,61 \pm 0,23$) mmol/l, Г II ($1,77 \pm 0,39$) mmol/l, Г III ($1,72 \pm 0,25$) mmol/l, Г IV ($1,68 \pm 0,29$) mmol/l (**Фигура 12**).



Фигура 12. Сравнение на серумните концентрации на фосфор в GI, GIІ, GIІІ и GIV. Липсват достоверни разлики между четирите групи. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение в mmol/l, n=70.

5.3. Резултати от определяне на серумния магнезий

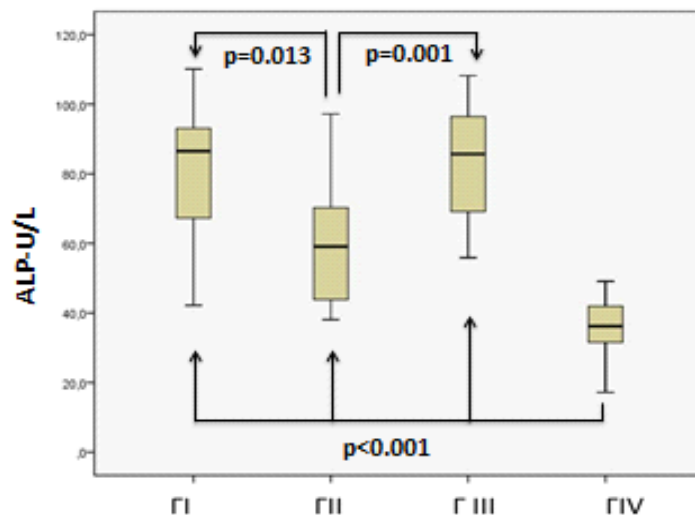
Резултатите от изследването показаха, че не съществуват статистически значими разлики в серумните концентрации на магнезий между експериментални групи животни: GI ($1,006 \pm 0,09$) mmol/l, GIІ ($1,056 \pm 0,12$) mmol/l, GIІІ ($0,99 \pm 0,06$) mmol/l, GIV ($0,99 \pm 0,12$) mmol/l (Фигура 13).



Фигура 13. Сравнение на серумните концентрации на магнезий в GI, GIІ, GIІІ и GIV. Липсват достоверни разлики между четирите групи. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение в mmol/l, n=70.

5.4. Резултати от определянето на серумната алкална фосфатаза

Дескриптивна статистика за серумната ALP при четирите групи животни установи статистически значими разлики между групите. Концентрациите на ALP бяха сигнификантно повишени в ГIII (83,09 ±15,9) U/L, ГII (62,29±19,4) U/L и в ГI (81,20±19,74) U/L спрямо контролната група ГIV (35,79±8,7) U/L, при ниво на значимост (**p<0.001). Също така концентрациите на ALP в ГI бяха сигнификантно повишени спрямо ГII, като съществува достоверна разлика между двете групи (*p=0.013). Концентрациите на ALP в ГIII също бяха сигнификантно повишени спрямо ГII, като съществува достоверна разлика между двете групи (*p=0.001) (Фигура 14).

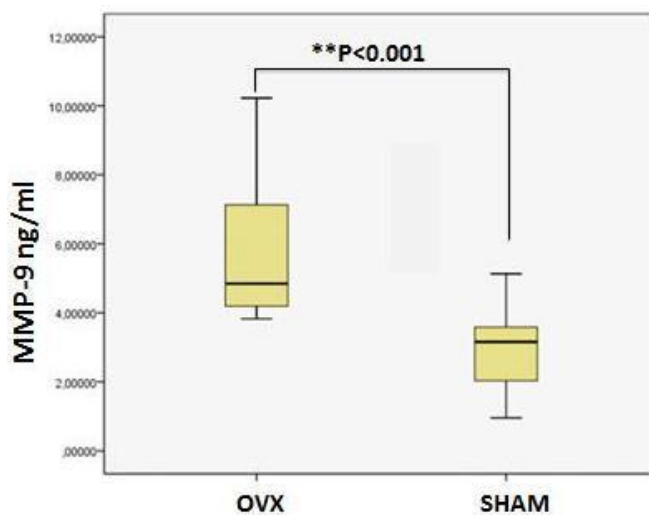


Фигура 14. Активността на серумната ALP при изследваните групи ГI, ГII, ГIII и ГIV. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение в U/L, n=70.

VI. РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЕРУМНИТЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НА MMP-9, MMP-13 И TIMP-1 ЧРЕЗ ELISA ПРИ ГРУПИТЕ ГIII И ГIV (OVX И SHAM)

6.1. Резултати от определянето на серумните концентрации на MMP-9

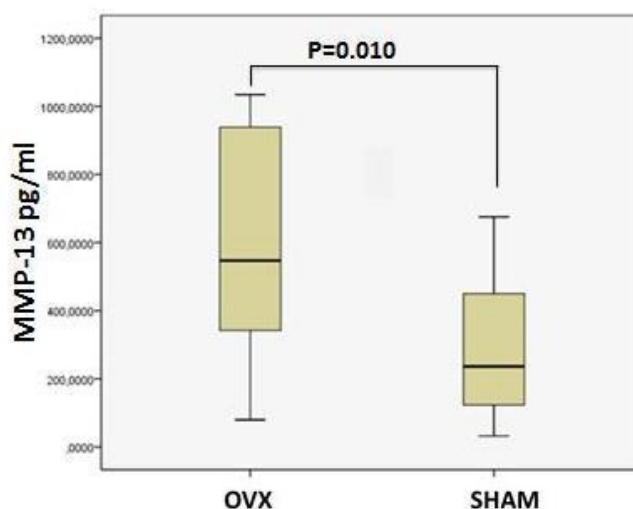
Установи се, че концентрациите на MMP-9 в ГIII ($5,81 \pm 1.98$) ng/ml бяха сигнификантно повишени спрямо тази в ГIV (2.95 ± 1.15) ng/ml, като съществува достоверна разлика между двете групи (** $p < 0.001$) (Фигура 15).



Фигура 15. Серумна MMP-9. Достоверна разлика в MMP-9 между групите ГIII и ГIV. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение в ng/ml, $n=40$.

6.2. Резултати от определянето на серумните концентрации на MMP-13

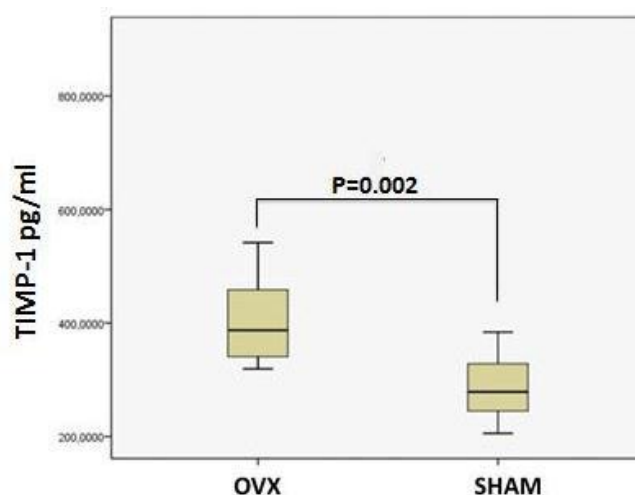
Резултатите от изследването показаха, че концентрацията на MMP-13 в ГIII ($612,68 \pm 336,50$) pg/ml беше сигнификантно повишени спрямо тази в ГIV ($311,60 \pm 253,70$) pg/ml, като съществува достоверна разлика между двете групи (* $p=0.010$) (Фигура 16).



Фигура 16. Серумна MMP-13. Достоверна разлика в MMP-13 между групи ГIII и ГIV. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение в pg/ml, n=40.

6.3. Резултати от определянето на серумните концентрации на TIMP-1

Резултатите от изследването показаха, че серумните концентрации на TIMP-1 в ГIII ($435,01 \pm 143,53$) pg/ml бяха сигнификантно повишени спрямо тези в ГIV ($289,04 \pm 55,8$) pg/ml, като съществува достоверна разлика между двете групи при ниво на значимост $*p=0.002$ (Фигура 17).

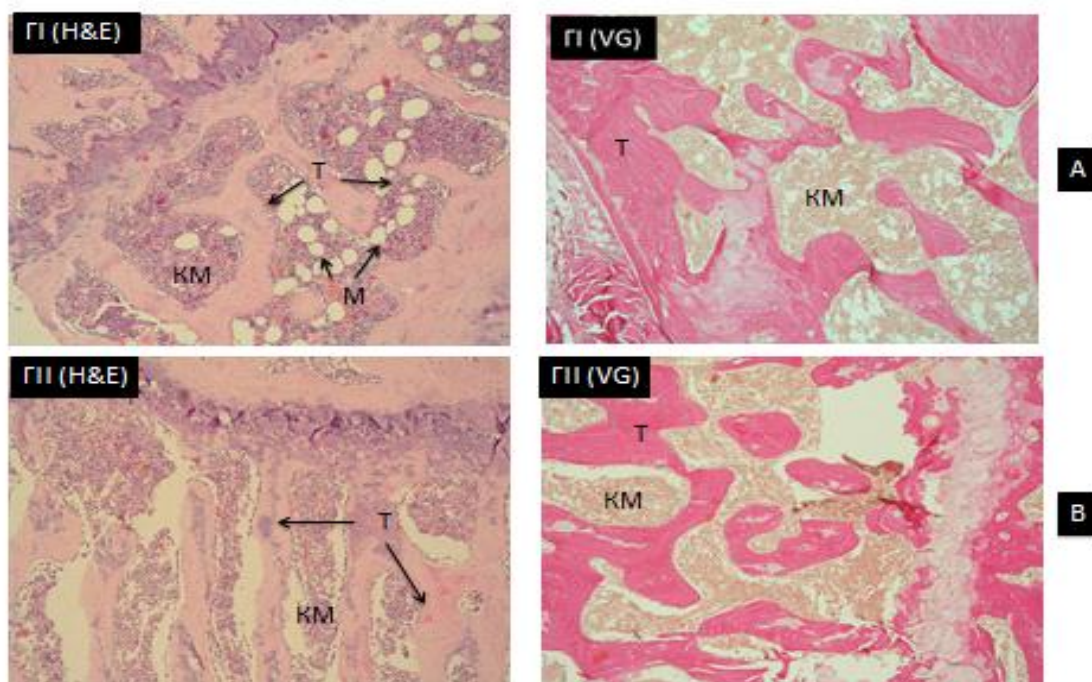


Фигура 17. Серумен TIMP-1. Достоверна разлика в TIMP-1 между групите ГIII и ГIV. Данните са представени като медиана, минимална и максимална стойност и стандартно отклонение в pg/ml, n=40.

VII. ХИСТОЛОГИЧНО И ХИСТОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОСТНАТА ТЪКАН ПРИ ЧЕТИРИТЕ ГРУПИ - ГІ, ГІІ, ГІІІ И ГІV

7.1. Хистологично изследване на феморалната кост при животни от група ГІ (OVX третирана с полимерни матрици) сравнена с група ГІІ (OVX третирана с полимерни матрици, натоварени с нанодиаменти)

Резултатите от морфологичното изследване на костната тъкан от ГІ група показва, че въпреки отклонения в минерализацията архитектурата е запазена. Понижен е броят на трабекулите, увеличени са интертрабекуларните разстояния и е налице загуба на свързаност между костните гредички. Наблюдава се и умерена мастна дегенерация на костния мозък (Фигура 18-А).

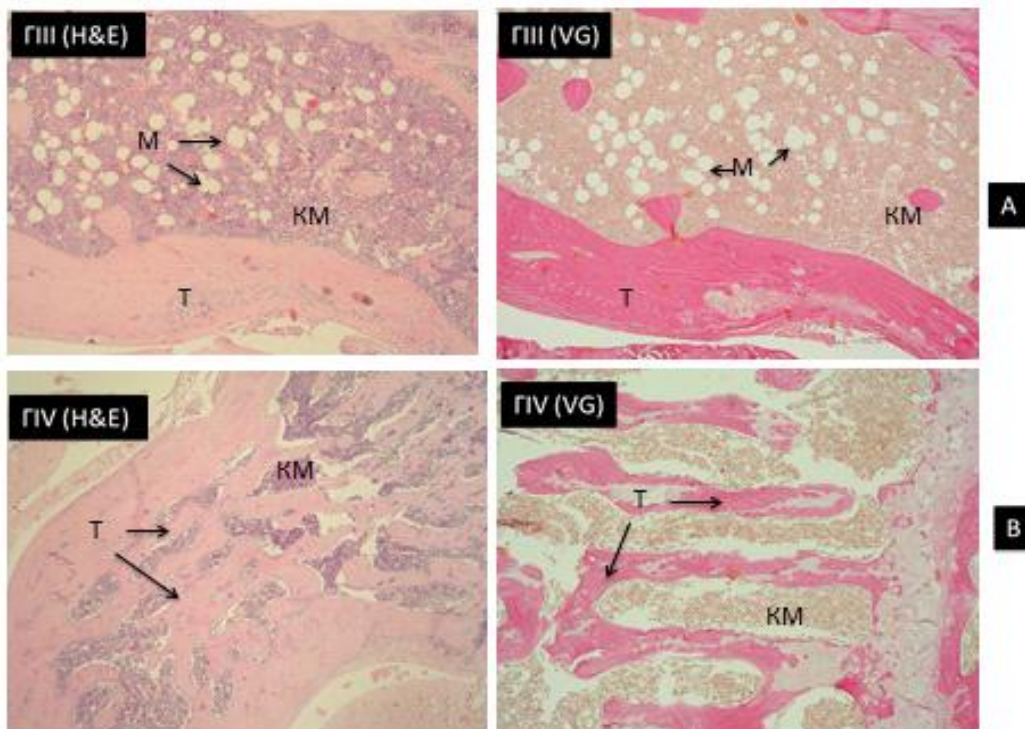


Фигура 18 (А и В). Представителна извадка от препарати на феморална кост. Ляв панел (H&E) - оцветяване с хематоксилин-еозин; Десен панел (VG) - оцветяване по Ван Гизон (за колагенови влакна). А: Животно от група ГІ; Б: Животно от група ГІІ. Увеличение x 100. Т-трабекули, КМ-костен мозък, М-мастна дегенерация.

За разлика от това, хистологичната картина на костната тъкан при група ГІІІ показва, че има леко отклонение в минерализацията. Запазена е архитектурата. Липсва изразена остеокластна активност по повърхността на костните гредички и отсъства мастна дегенерация наблюдаваната при групата ГІ (Фигура 18-В).

7.2. Хистологично изследване на феморалната кост при животни от ГІІІ (OVX група с остеопороза) сравнена с група ГІV (SHAM група без остеопороза)

Резултатите от морфологичното изследване на костната тъкан от ГІІІ групата показва, че се наблюдава изразена костна загуба и деминерализация на костните гредички. Има наличие на изтънени трабекули и прекъсване на връзките между всяка една от тях. Разширени са костно-мозъчните пространства с изразена мастна дегенерация на костния мозък (Фигура 19-А).



Фигура 19 (А и В). Представителна извадка от препарати от на феморална кост. Ляв панел (H&E) - оцветяване с хематоксилин-еозин; Десен панел (VG) - оцветяване по Ван Гизон (за колагенови влакна). А:

Животно от група ГIII; Б: Животно от група ГIV. Увеличение x 100. Т-трабекули, КМ-костен мозък, М-мастна дегенерация.

За разлика от това хистологичната картина от ГIV групата е с запазена морфологична структура на костта (**Фигура 19-В**).

VIII. РЕЗУЛТАТИ ОТ ИМУНОХИСТОХИМИЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ

Имунохистохимично беше изследвана експресията на MMP-9, MMP-13, SPARC и COL-1 върху препарати от проксималния фрагмент на бедрената кост при четирите групи експериментални животни. За статистическата обработка беше използван непараметричен тест на Mann Whitney (W) сравняващ медианни стойности.

8.1. Имунохистохимично изследване на експресията на MMP-9

Експресията на MMP-9 в остеокластите и в мононуклеарните клетки (в костномозъчното пространство) беше сигнификантно повишена при естрогенен дефицит, което беше наблюдавано в групата с остеопорозата ГIII (OVX) спрямо ГIV (SHAM) ($p < 0,001$). Интраосалното приложение на композитните наноматериали сигнификантно намалява експресията на ензима в остеокласти в ГI спрямо ГIII, ($p = 0.004$). Съществува също статистически значима разлика в експресията на MMP-9 между ГI и контролната група без остеопорозата (ГIV), ($p = 0.012$). Прилагането на полимери, съчетано с нанодиаменти сигнификантно намалява експресията на MMP-9 в остеокласти в ГII спрямо ГIII, ($p = 0.001$), като не са отчитат сигнификантни разлики в експресията на ензима между ГII и ГIV, ($p = 0.261$). Също така се наблюдава значима разлика в експресията на MMP-9 между ГI и ГII, като интензивността на оцветяването е значително по-слаба в ГII спрямо ГI, ($p = 0.041$). **Таблица 3** показва количествената оценка на експресията на MMP-9 при четирите групи - ГI, ГII, ГIII и ГIV животни.

Таблица 3. Количествена оценка на експресията на MMP-9 в Ок.

Групи (MMP-9)	Брой препарати (n)	Интензивност	
		на оцветяването ¹ /	Процент (%) ²
ГI	4/15	0	26,7%
	1/15	1	6,7%
	6/15	2	40,0%
	4/15	3	26,7%
ГII	6/15	0	40,0%
	6/15	1	40,0%
	3/15	2	20,0%
ГIII	1/10	2	10,0%
	9/10	3	90,0%
ГIV	6/10	0	60,0%
	4/10	1	40,0%

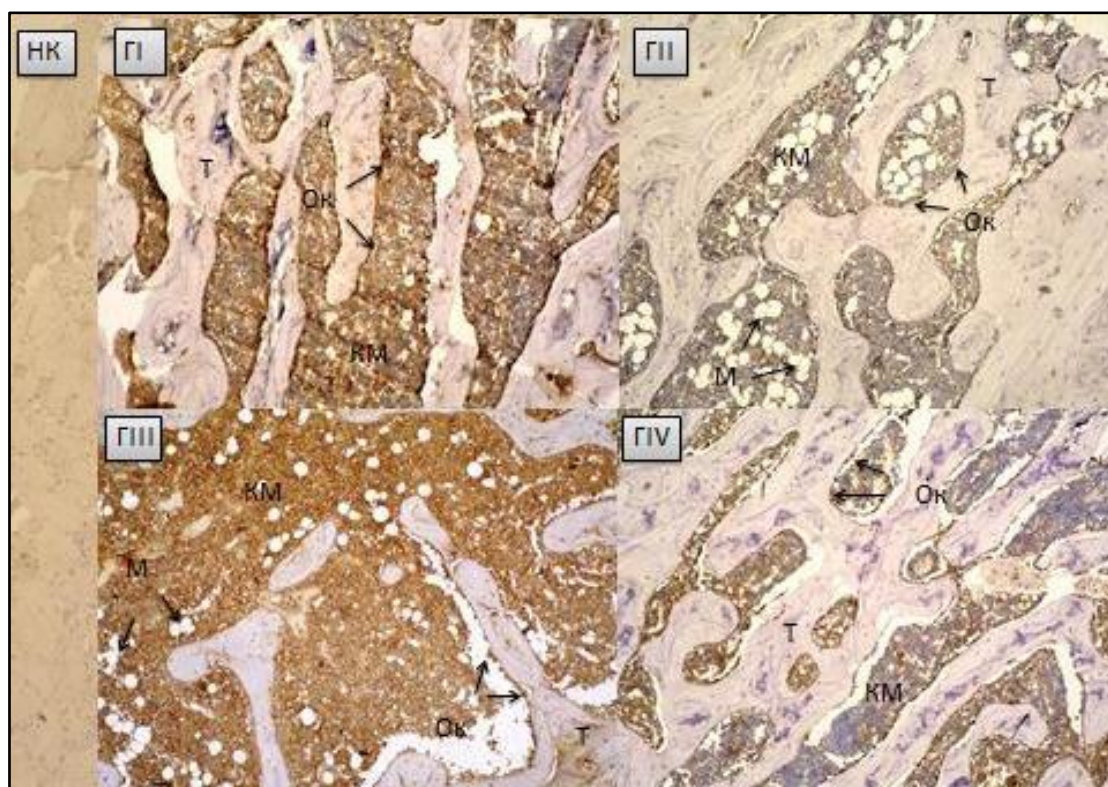
Забележка

1 Интензивност на оцветяване на ИХХ препарати по следната скала:

- 0 - липсва,
- 1 - слабо,
- 2 - умерено и
- 3 - силно.

2 Процент на препаратите според степента на оцветяване.

На **фигура 20.** е показано ИХХ оцветяване на MMP-9 при ГI, ГII, ГIII, ГIV групите и негативната контрола (НК).



Фигура 20. ИХХ на MMP-9 в препарати от бедрена кост. Показана е вариабилна имунна реакция на MMP-9 (от умерена до силна) в Ок (по повърхността на трабекулите) и в мононуклеарните клетки в костномозъчното пространство (стрелки), светло кафяво оцветяване. НК-негативна контрола (липсва ИХХ на MMP-9) Ув. x 100. (КМ-костен мозък, Т-трабекули, М- мастна дегенерация).

- ГІ е група подложена на двустранна OVX и третирана с полимерни матрици. ИХХ оцветяване на MMP-9 е умерено изразено в остеокластите (2).
- ГІІ е група подложена на двустранна OVX и третирана с полимерни матрици, натоварени с нанодиаменти. ИХХ оцветяване на MMP-9 е слабо изразено в остеокластите (1).
- ГІІІ е група с двустранна OVX. ИХХ оцветяване на MMP-9 е силно изразено в остеокластите и в моноклеарните клетки, запълващи костномозъчното пространство (3).
- ГІІІІ е SHAM група. ИХХ оцветяване на MMP-9 е слабо изразено в остеокластите (1).

8.2. Имунохистохимично изследване на експресия на MMP-13

Експресията на MMP-13 беше сигнификантно повишена при естрогенен дефицит, което беше наблюдавано в групата с остеопорозата ГІІІ спрямо ГІІІІ, ($p < 0.001$). Интраосалното приложените полимери с нанодиаменти сигнификантно намалява експресията на ензима в ГІІ спрямо ГІІІ (група с остеопорозата), ($p < 0.001$) и не се различава спрямо ГІІІІ, ($p = 0.103$). Прилагането на композитите, сигнификантно намалява експресията на MMP-13 в ГІ спрямо ГІІІ ($p = 0.019$), както и между ГІ спрямо ГІІІІ ($p = 0.031$). Не беше наблюдавана сигнификантна разлика в експресията на MMP-13 между ГІ и ГІІ, ($p = 0.233$). **Таблица 4** показва количествената оценка на експресията на MMP-13 при четирите групи - ГІ, ГІІ, ГІІІ и ГІІІІ.

Таблица 4. Количествена оценка на експресията на ММР-13 в Об и Оц.

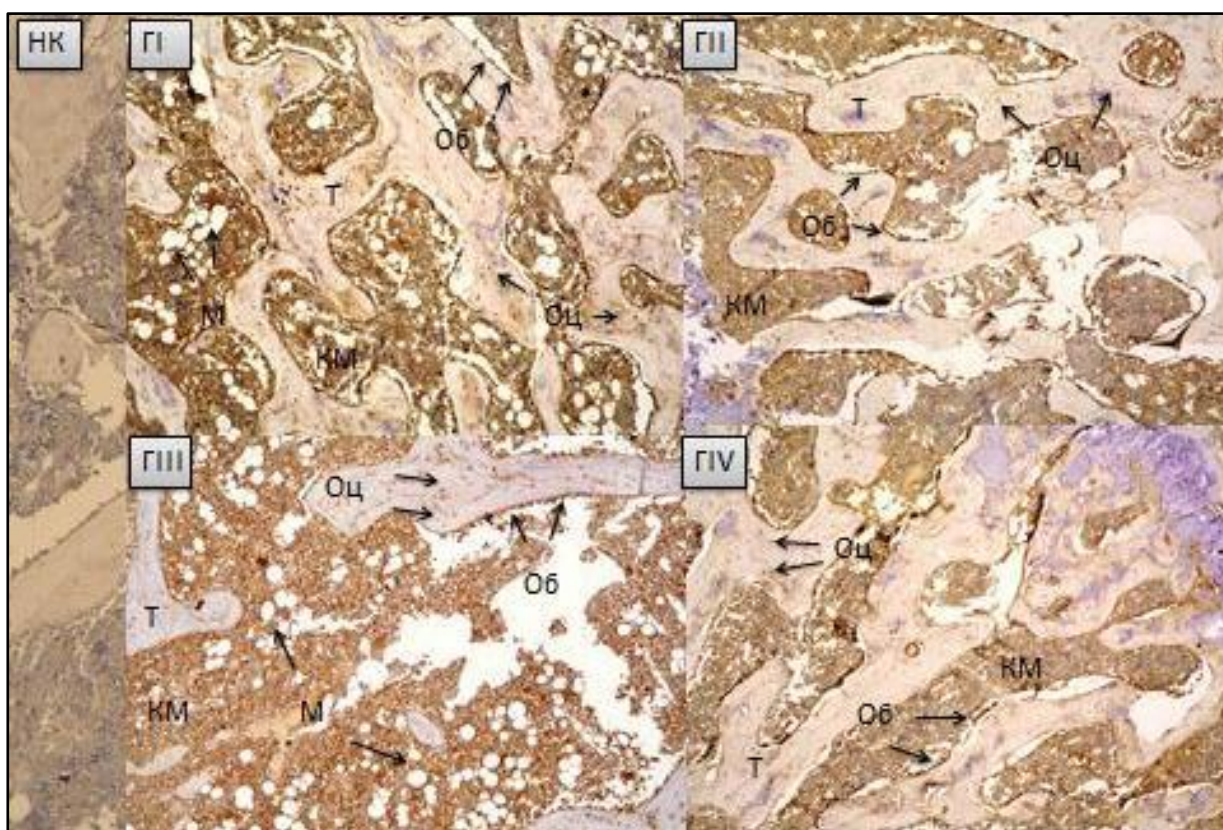
Групи (ММР-13)	Брой препарати (n)	Интензивност на оцветяването ¹ / Процент (%) ²	
ГI	4/15	0	26,7%
	2/15	1	13,3%
	6/15	2	40,0%
	3/15	3	20,0%
ГII	4/15	0	26,7%
	6/15	1	40,0%
	5/15	2	33,3%
ГIII	4/10	2	40,0%
	6/10	3	60,0%
ГIV	6/10	0	60,0%
	3/10	1	30,0%
	1/10	2	10,0%

Забележка

1 Интензивност на оцветяване на ИХХ препарати по следната скала:
 0 - липсва,
 1 - слабо,
 2 - умерено и
 3 - силно.

2 Процент на препаратите според степента на оцветяване.

На **фигура 21.** е показано ИХХ оцветяване на ММР-13 при ГI, ГII, ГIII, ГIV групите и негативната контрола (НК).



Фигура 21. ИХХ реакция на ММР-13 в препарати от бедрена кост. Показано е слабо, умерено до силно дифузно оцветяване за ММР-13 в Об (по повърхността на трабекулите) и в Оц (стрелки), кафяво оцветяване, НК-негативна контрола (липсва ИХХ на ММР-13), Ув. x 100. (КМ-костен мозък, Т-трабекули, М- мастна дегенерация).

➤ ГІ е група подложена на двустранна OVX и третирана с полимерни матрици. ИХХ оцветяване на MMP -13 е умерено изразено в Об и в Оц (2).

➤ ГІІ е група подложена на двустранна OVX и третирана с полимерни матрици, натоварени с нанодиаменти. ИХХ оцветяване на MMP -13 е слабо изразено в Об и в Оц (1).

➤ ГІІІ е група с двустранна OVX. ИХХ оцветяване на MMP -13 е силно изразено в Об и в Оц (3).

➤ ГІІV е SHAM група. ИХХ оцветяване на MMP -13 е слабо изразено в Об и в Оц (1).

8.3. Имунохистохимично изследване на експресия на SPARC

Установи се, че експресията на SPARC беше сигнификантно понижена при естрогенен дефицит, което беше наблюдавано в групата с остеопорозата ГІІІ спрямо ГІV (SHAM), ($p=0.007$). Прилагането на полимерни матрици не е свързано със установяване на статистически значима разлика в експресията на ензима в ГІ спрямо ГІІІ ($p=0.495$) и съответно показва такава разликата с ГІV, ($p=0.016$). Прилагането на полимери с нанодиаменти сигнификантно увеличава експресията на SPARC в ГІІ спрямо ГІІІ ($p=0.008$), като не са отчита сигнификантна разлика между ГІІ и ГІV, ($p=0.892$). Също така увеличената експресия на SPARC в ГІІ показва статистически значима разлика с ГІ, ($p=0.015$). **Таблица 5** показва количествената оценка на експресията на SPARC при четирите групи - ГІ, ГІІ, ГІІІ и ГІV.

Таблица 5. Количествена оценка на експресията на SPARC в Об и Оц.

Групи (SPARC)	Брой препарати (n)	Интензивност на оцветяването ¹ / Процент (%) ²	
GI	8/15	0	53,3%
	7/15	1	46,7%
GII	3/15	0	20,0%
	6/15	1	40,0%
	5/15	2	33,3%
	1/15	3	6,7%
GIII	7/10	0	70,0%
	3/10	1	30,0%
GIV	1/10	0	10,0%
	6/10	1	60,0%
	3/10	2	30,0%

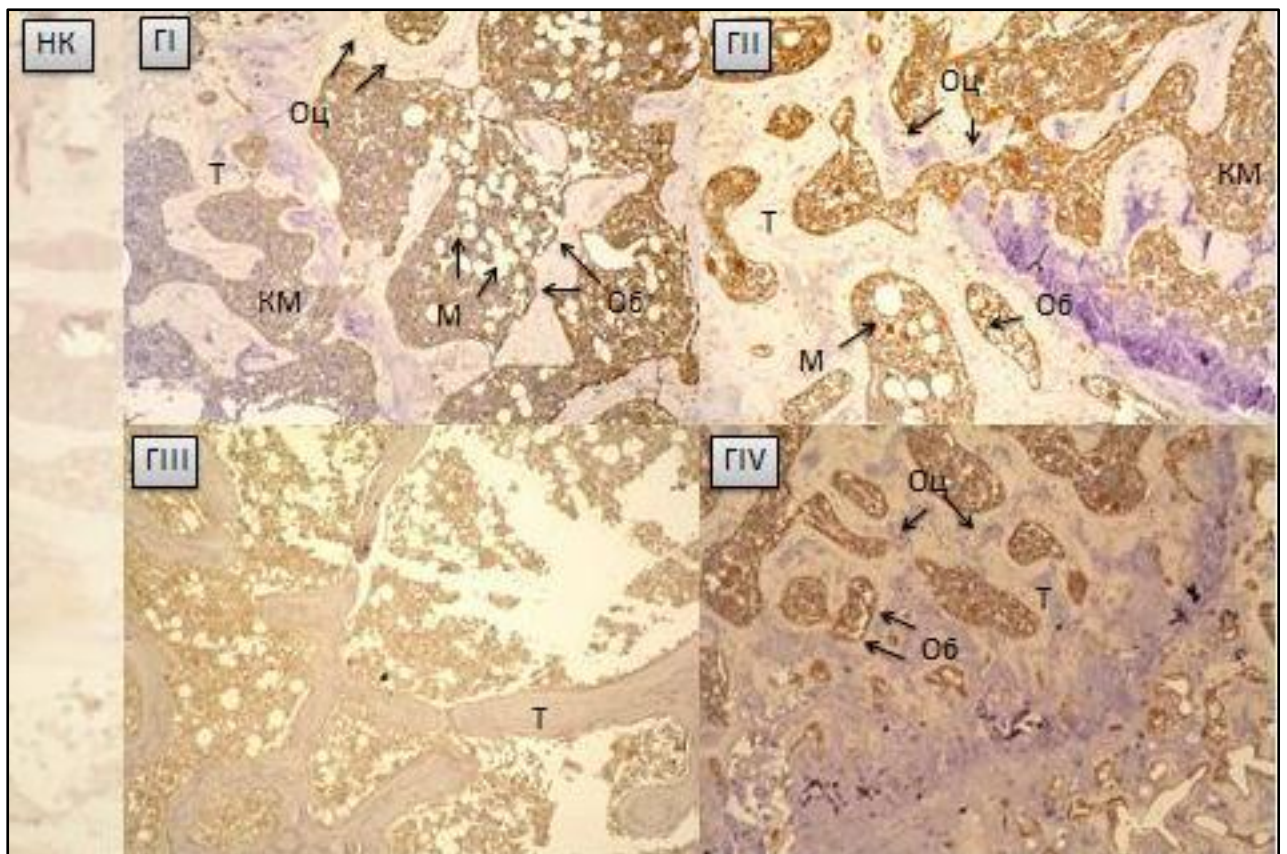
Забележка

1 Интензивност на оцветяване на ИХХ препарати по следната скала:

- 0 - липсва,
- 1 - слабо,
- 2 - умерено и
- 3 - силно.

2 Процент на препаратите според степента на оцветяване.

На **фигура 22.** е показано ИХХ оцветяване на SPARC при GI, GII, GIII, GIV групите и негативната контрола (НК).



Фигура 22. ИХХ реакция на SPARC в препарати от бедрена кост. Показана е слаба и силна експресия на SPARC в Об (по повърхността на трабекулите) и в Оц, кафяво оцветяване, НК-негативна контрола (липсва ИХХ на SPARC) , Ув. x 100. (КМ-костен мозък, Т-трабекули, М-мастна дегенерация).

➤ ГІ е група, подложена на двустранна OVX и третирана с полимерни матрици. ИХХ оцветяване на SPARC е от слабо до умерено изразено в Об и в Оц (0-1).

➤ ГІІ е група, подложена на двустранна OVX и третирана с полимерни матрици, натоварени с нанодиаменти. ИХХ оцветяване на SPARC е силно изразено в Об и в Оц (3).

➤ ГІІІ е група с двустранна OVX. ИХХ оцветяване на SPARC е слабо изразено в Об и в Оц (0).

➤ ГІІV е от SHAM група. ИХХ оцветяване на SPARC е силно изразено в Об и в Оц (3).

8.4. Имунохистохимично изследване на експресия на COL-1

По време на изследването беше установено, че експресията на COL-1 сигнификантно намалява при естрогенен дефицит, което се наблюдава в групата с остеопорозата ГІІІ спрямо ГІV, ($p=0.007$). Интраосалното приложение на нанокompозитните материали, сигнификантно повишава експресията на COL-1 в матрикса при ГІІ спрямо ГІІІ (група с остеопорозата), ($p=0.002$) и не показва статистически значима разлика с ГІV, ($p=0.461$). Прилагането на композитите в ГІ, не променя статистически значимо експресията на COL-1 спрямо ГІІІ ($p=0.103$) и ГІV ($p=0.285$). Също така не се отчита сигнификантна разлика в експресията на COL-1 между групите ГІ и ГІІ, ($p=0.074$). На **Таблица 6** е показана количествената оценка на експресията на COL-1 при четирите групи - ГІ, ГІІ, ГІІІ и ГІV.

Таблица 6. Количествена оценка на експресията на COL-1 в Об, Оц и матрикса.

Групи (COL-1)	Брой препарати (n)	Интензивност на оцветяването ¹ / Процент (%) ²	
		0	33,3%
GI	5/15	0	33,3%
	5/15	1	33,3%
	4/15	2	26,7%
	1/15	3	6,7%
GII	2/15	0	13,3%
	4/15	1	26,7%
	4/10	2	26,7%
	5/10	3	33,3%
GIII	6/10	0	60,0%
	4/10	1	40,0%
GIV	1/10	0	10,0%
	4/10	1	40,0%
	4/10	2	40,0%
	1/10	3	10,0%

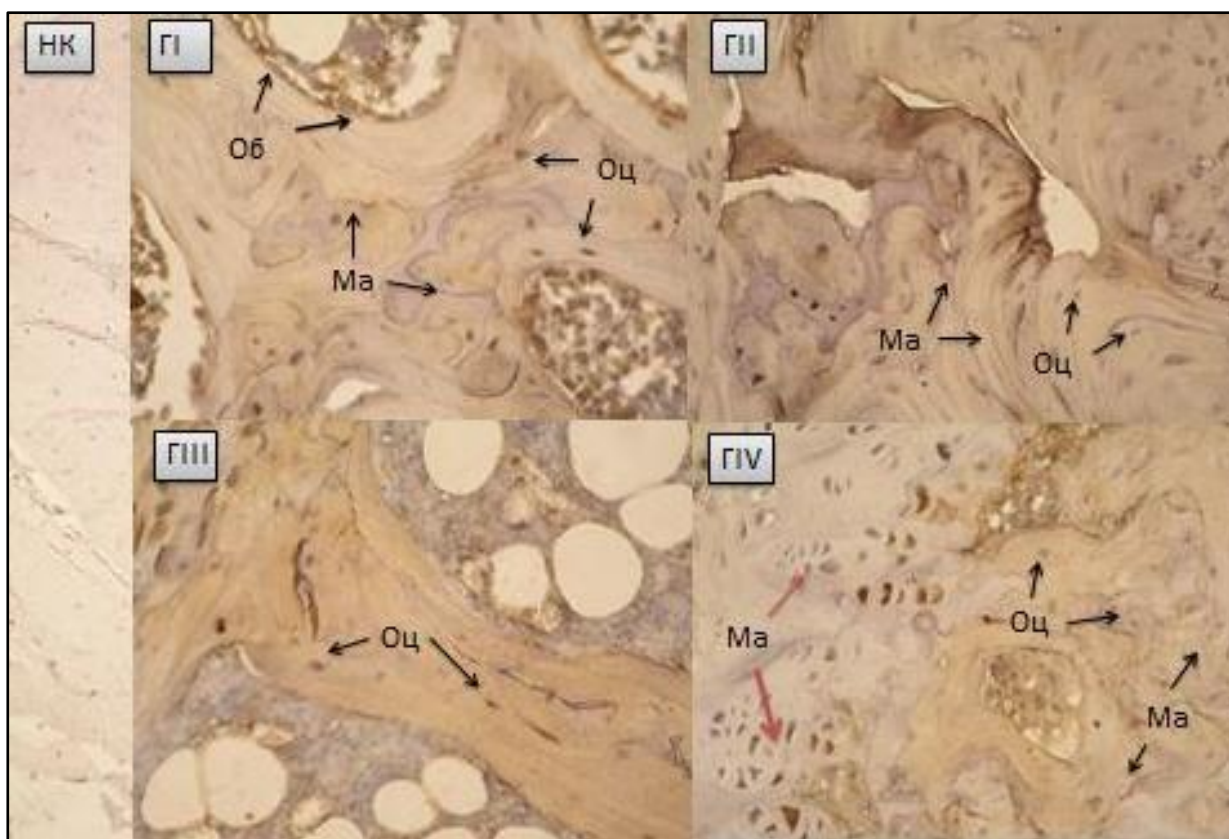
Забележка

1 Интензивност на оцветяване на ИХХ препарати по следната скала:

0 - липсва,
1 - слабо,
2 - умерено и
3 - силно.

2 Процент на препаратите според степента на оцветяване.

На **фигура 23.** е показано ИХХ оцветяване на COL-1 при GI, GII, GIII, GIV групите и негативната контрола (НК).



Фигура 23. Представителна извадка от ИХХ оцветяване за COL-1 в препарати от бедрена кост. Показана е ИХХ на COL-1 в остеоцити, остеобласти и в костния матрикс (Ма) (стрелки), кафяво оцветяване. НК-негативна контрола (липсва ИХХ на COL-1). Ув. x 400.

➤ ГІ е група подложена на двустранна OVX и третирана с полимерни матрици. ИХХ оцветяване на COL-1 е слабо изразено в Об, в Оц и в матрикса (1).

➤ ГІІ е група подложена на двустранна OVX и третирана с полимерни матрици, натоварени с нанодиаменти. ИХХ оцветяване на COL-1 е силно изразено в Об, в Оц и основно в матрикса (3).

➤ ГІІІ е група с двустранна OVX. ИХХ оцветяване на COL-1 е от слабо изразено в единични Оц и липсва в матрикса и в Об (1-0).

➤ ГІІV е от SHAM контролна група. ИХХ оцветяване на COL-1 е равномерно и силно изразено в Об, в Оц и основно в матрикса (3). Наличие на минерализиран колаген в матрикса (червени стрелки) и новосинтезиран матрикс (черни стрелки) стрелки.

9. ПОЛУЧЕНИ КОРЕЛАЦИИ ОТ ИМУНОХИСТОХИМИЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ НА MMP-9, MMP-13, SPARC и COL-1

- **В ГІ** Съществува положителна значителна корелация на ИХХ експресия между SPARC и COL-1 ($p=0.048$; $r=0.519^*$) и положителна висока корелация между MMP-9 и MMP-13 ($p < 0.001$; $r=0.868^{**}$).
- **В ГІІ** Съществува положителна значителна корелация на ИХХ експресия между SPARC и COL-1 ($p=0.031$; $r=0.556^*$) и положителна висока корелация между MMP-9 и MMP13 ($p=0.003$; $r=0.703^{**}$).
- **В ГІІІ** Съществува положителна висока корелация на ИХХ експресия между SPARC и COL-1 ($p=0.005$; $r=0.802^{**}$).
- **В ГІІV** Съществува положителна висока корелация на ИХХ експресия между SPARC и COL-1 ($p=0.006$; $r=0.799^{**}$); положителна много висока корелация между MMP-9 и MMP13 ($p < 0.001$; $r=0.976^{**}$); положителна висока корелация между MMP-9 и SPARC ($p=0.009$; $r=0.773^{**}$); положителна висока корелация между MMP-13 и SPARC ($p=0.007$; $r=0.790^{**}$).

V. ОБСЪЖДАНЕ

Менопаузата е физиологичен и естествен етап от живота на жената, свързващ репродуктивния ѝ период със старостта. Спирането на функцията на яйчниците може да бъде свързано и с друг патологичен проблем подобен на индуцираната менопауза след двустранна оваректомия или ятрогенна аблация след химио- или лъчетерапия. Ендокринният дисбаланс, настъпващ при менопауза има сериозно отражение върху целия организъм и особено върху костната система. В последните години се обръща голямо обществено внимание на остеопорозата, тъй като тя е определена от СЗО като третото най-масово и социално значимо заболяване на планетата. Причината, най-вероятно се крие във факта, че протича скрито, без каквато и да било симптоматика, и затова е наречена „*тихият убиец*“. Първият признак на заболяването е деформация на гръбначния стълб (прегърбване), свързано с костно-прешленни фрактури вследствие на увеличената поръзност на прешлените. Плътноста на костите постепенно намалява, в резултат на което те стават крехки и чупливи. Въпреки, че в процеса на остеопороза е въвличена цялата костна система, фрактурите на бедрената кост са тежки, защото променят целия живот на пациента и отнемат неговата свобода. Съвременното фармакологично лечение на остеопорозата включва комбинация от антирезорбтивни и кост-изграждащи медикаменти. Те намаляват костната резорбция и постепенно възстановяват костната структура, но са малко ефективни при лечение на фрактури, възникнали вследствие на остеопорозата. Оперативната интервенция често е безрезултатна, във връзка с високата крехкост на костите. Това обрича пациентите на страдания и дълго залежаване в болнично заведение. Наноматериалите,

които се предлагат като подпомагащ фактор при оперативна интервенция при пациенти с остеопорозата, имат за цел минимизиране на усложненията и усиляване на костната регенерация, което помага за бързото възстановяване на пациентите.

Експериментален модел на остеопорозата

За тази цел бе използван модел на остеопорозата предложен от (Kharode Y.P. и съавт., 2008). Опитите бяха проведени върху женски плъхове порода Вистар. Женските плъхове, след овариектомия, развиват сходни признаци на костни промени, както при човешката постменопаузална остеопороза. Този експериментален модел е възприет като „златен стандарт“ за оценка на ефекта от лечението с редица медикаменти, използвани при остеопорозата.

Овариектомията на плъхове води до ендокринен дисбаланс, в резултат на което намалява производството на естрогени с успоредното покачване на FSH и задействане на системата RANK-RANKL-OPG, което се наблюдават и при хора. Това предизвиква значително стимулиране на костната резорбция и води до бърза загуба на костния матрикс, което е в основата на развитие на остеопорозата при менопауза. По време на нашия експеримент беше доказано развитието на остеопороза по няколко начина след извършване на овариектомия. Първо, с помощта на система Li-COR за *in vivo* сканиране, беше проследено развитието на остеопорозата в динамика. Резултатите, получени от сканирането на животните, отговаряха на степента на костната минерализация. Максимален интензитет на излъчването и съответно добра минерализация беше отчетена у животните от SHAM групата. Втори по интензитет на излъчването бяха класирани животните, третирани с PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ с нанодиаменти (Фигури 6 и 10). Това показва положителния ефект на полимерните композити върху костната минерализация. Най-слабо регенерира костна тъкан, отговаряща на най-слабото излъчване при сканирането, имаха

животните от OVX група. Наличие на остеопороза беше доказано и с помощта на извършения нанонатиск върху екплантираните бедрени кости. Бяха установени достоверни разлики между животните от SHAM групата и тези с остеопороза (**Фигури 7 и 8**). При здрави животни и хора специфичната структура на костната система осигурява тяхната изключителна якост и частична еластичност. Костната тъкан на животните по време на нашия експеримент, развили остеопороза, притежаваше по-малка твърдост на феморалната кост, измерена в епифизарните и диафизарната част. Беше отчетена по-голяма еластичност на костта в средната ѝ област и се регистрира по-голяма дълбочина на проникване в епифизния участък (**Фигури 7 и 8**). Отчетените промени потвърждават увеличената възможност към фрактури на костта, дори при незначителни натоварвания. Подобни проведени изследвания са описват и други автори. Успешното развитие на модела за остеопороза беше потвърдено и с помощта на хистологични изследвания. Костната структура при животните с остеопорозата се характеризира с изтънени трабекули, с разширени костно-мозъчни пространства и проявена мастна дегенерация на костен мозък (**Фигура 9**). Подобен метод за потвърждаване на възникнала остеопороза използват и други автори при моделиране на експериментална остеопороза, най-често върху плъши модели.

Промени в теглото при експерименталните групи

Получените от нас данни показват, че всичките овариектомирани плъхове статистически достоверно увеличават теглото си спрямо контролите, като най-малка е скоростта на нарастването на теглото в група ГII третирана с PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ + ND (**Фигури 2 и 3**). При тази група увеличението на теглото е най-ниско в сравнение с тези при ГIII и ГII. От литературата е известно, че естрогенният дефицит води до увеличаване на теглото у експерименталните животни и жени в менопаузата. Мастната тъкан притежава ендокринна и паракринна

активност, свързана с производството на различни биологично активни вещества като: естрогени, адипонектин, адипсин, лептин, провъзпалителни цитокини IL6 и TNF- α , резистин, ангиотензиноген, плазминогенов активатор-инхибитор 1 (PAI-1), тъканен фактор и др. Тяхното влияние върху костната тъкан е различно. Повечето литературни данни сочат, че затлъстяването при естрогенен дефицит предпазва от остеопороза е свързано с повишената ароматазна активност, водеща до продукцията на естрадиол, който намалява костната резорбция и повишава костното формиране. Също така е доказано, че лептинът намалява остеокластогенезата и има протективен ефект върху костите при жени в постменопауза .

Съществува връзка между затлъстяването и активността на MMPs. Инхибиторът-1 на плазминогенния активатор (PAI-1) се секретира и се експресира в мастната тъкан, както при човек, така и при гризачите. PAI-1 инхибира фибринолитичния процес чрез блокирането на тъканния тип плазминогенен активатор (t-PA) и урокиназия тип плазминогенен активатор (u-PA). Повишеното плазмено ниво на PAI-1 при затлъстяване е основната причина за развитието на инсулинова резистентност, метаболитен синдром, атеротромботични усложнения, но е и фактор предпазващ от развитие на остеопороза. Експериментално върху OVX мишки е доказана важната роля на PAI-1 в патогенезата на естрогендефицитната остеопороза. Редица автори твърдят, че високите стойности на PAI-1 инхибират освобождаването на плазмин, който е важен активатор на латентните форми на MMPs, деградиращи ЕЦМ. Потвърдена е тезата, че свръхекспресията на PAI-1 подобрява геометричните, биомеханичните и минералните характеристики на костите у експерименталните мишки .

Днес са подложени на съмнение предишните твърдения, че обезитет е протекция за костната тъкан в периоди на пре- и постменопаузата. Не се

опровергава, че КМП се повишава при обезитет, но това не намалява риска от фрактури. Последни данни показват, че детското затлъстяване също е свързано с повишен риск от фрактури на долните крайници, независимо от повишаването на КМП. При затлъстяване в период на постменопаузата, както и при затлъстяване в детска възраст се повишават стойностите на КМП, но се нарушава отношението между кортикалната и трабекуларната архитектурата, и показателите за якост. Това прави кости по-податливи към фрактури. Експериментите върху животните доказват обратното, че OVX увеличава теглото на животните, но намалява КМП. Според авторите в основата на патогенезата стои нарушен метаболизъм водещ до високата активност на арахидоновата киселина, увеличаваща продукцията на кострезорбиращите простагландини и левкотриени. Други автори твърдят, че затлъстяването при жените след менопауза увеличава КМП, но пък става причина за обездвижване. Това съответно увеличава натовареността върху костите и отново повишава риска от фрактури.

Ние установихме, че затлъстяване съчетано с остеопорозата се наблюдава при всички OVX групи животни в сравнение с SHAM-контролната група (**Фигура 2**). Бе установено, че в групата третирана с биохибридни наноматериали има по-слабо покачване на теглото, без изявени хистологични промени на костта характерни за остеопороза в сравнение с другите две OVX групи (**Фигура 3**). На базата на литературните данни, получените резултати в промяната на теглото и хистологичната картина на костта при всички експериментални групи, ние можем да предположим, че PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ натоварен с нанодиаманнти локално блокират адипоцитната диференциация и увеличават остеобластната, което стимулира костното формиране в ГП групата.

Промените в серумната концентрация на калций, магнезий, фосфор при експерименталните групи

Калцият, фосфорът и магнезият имат основно значение за костното развитие, костната минерализация и формирането на костната минерална плътност. Костната маса се оформя до 25-30 годишна възраст. Колкото повече и по-здрава е тя, толкова е по-малък рискът от развитие на остеопороза. Костната маса се определя от диетата (дали е достатъчно богата на калций, фосфор, магнезий и витамин Д), от физическата активност и от хормоналното състояние. Промените в серумните показатели за Са, Р и Mg при остеопорозата са добре проучени при хора и животни, но резултатите са противоречиви.

Литературни данни сочат, че при естрогенен дефицит индуцираната остеопороза не се наблюдават промени в серумните концентрации на Са, Р и Mg. Електролитният дисбаланс е от диагностично значение и при други етиологични фактори, водещи до остеопорозата, например хронична бъбречна недостатъчност; хиперпаратиреоидизъм, туморни заболявания и др. Едни автори твърдят, че нивата на Са и Р у плъхове след OVX-индуцираната остеопорозата се повишават, докато други доказват обратното. Намаление на серумната концентрация на естрогените увеличава резорбтивния ефект на паратироидния хормон (PTH), което води до хиперкалциемия, хиперфосфатемия и хипомагнезиемия. Активира се компенсаторен механизъм, който забавя чревната резорбция и увеличава бъбречната екскреция на калций, с което организмът се старее да намали минералната загуба и да нормализира електролитната хомеостаза.

Магнезият, който е важен елемент за много ензимни реакции в организма, взема активно участие в калциево-фосфорната обмяна. Той е физиологичен калциев антагонист и се намира в реципрочни отношения с

калция. Хиперкалциемия води до хипомагнезиемия, а тя има следните ефекти:

- директно инхибира остеобластното развитие и стимулира остеокластогенезата чрез стимулирана продукция на цитокини (субстанция P, TNF α , IL1 β и др), които нарушавайки взаимодействието RANK-RANKL-OPG повишават костната резорбция.
- индиректно нарушава секрецията на PTH и чувствителността на таргетните клетки към действието на хормона, водейки до намалена продукция на витамин Д₃. По този начин хипомагнезиемията води до развитието и на хипокалциемия.

Следователно, естрогененият дефицит отключва патогенетичен порочен кръг водещ до електролитен дисбаланс, който директно и индиректно влияе върху костната тъкан с развитие впоследствие на остеопороза.

Нашето изследване показва, че няма статистически значими разлики в серумните концентрации на Ca, P и Mg при различните групи експериментални животни (**Фигури 11, 12 и 13**), което се доказва и от други автори. Това, най-вероятно се дължи на факта, че при младите животни компенсаторните механизми са по-добре изразени, което се потвърждава от измерените нормални серумни нива на показателите. По-голямата част от P и Mg в организма на човека и животните са намират в тъканите и клетките, докато извънклетъчното пространство съдържа малък % от общото количество на въпросните макроелементи. Следователно, на практика определянето на серумните концентрации на Ca, P и Mg при естрогендефицитна остеопороза не е винаги ефективно за клиничната диагностика на заболяването.

- **Алкална фосфатаза като маркер за костното формиране**

Алкалната фосфатаза е цинк съдържащ металоензим, който се активира от Mg и други двувалентни йони. ALP е ензим, отнасящ се към групата на

хидролазите. Названието „алкална“, ензимът получава, защото проявява най-голяма активност при наличие на рН на средата в диапазона от 8.6 до 10.1. ALP участва в реакциите на дефосфолиране, а именно – отделяне на фосфатните групи от органичните вещества. Процесът протича на молекулярно ниво. В организма на човека ензимът присъства практически навсякъде, във всички тъкани, но е представен в няколко разновидности, като бъбречна, чревна, плацентна, чернодробна и костна ALP. Най-високи концентрации на този ензим се установява в клетките на костите и черния дроб. Костната фракция на ALP участва в процесите на костобразуване и минерализацията. ALP се повишава при заболявания на скелетната система, свързани с повишена остеобластна активност и костно ремоделиране. Тя е един от най-често използваните серумни маркери за костното формиране. Повишена ALP е индикатор за ускореното костно ремоделиране, наблюдавано при възстановяване на костта от остеопороза причинена от естрогенен дефицит. Липсата на естрогени стимулира остеобластогенезата. Преостеобластите започват да експресират голямо количество ALP (един от най-ранните маркери за остеобластния фенотип). Преостеобластите спират да пролиферират като започва тяхната диференциация в остеобласти. Активирания остеобласт обогатен с ALP, започва да секретира костни матриксни протеини като колаген тип I и няколко не-колагенови протеина, като остеокалцин, остеопонтин, остеонектин и костен сиалопротеин II (BSP II). Като правило, ALP и паратиroidният рецептор тип 1 (PTH1R) са ранни маркери на остеобластната активност и се увеличават, когато остеобластите съзряват и формират матрикс. Те отново намаляват при трансформиране на остеобластите в остеоцити.

Резултатите от нашето проучване показват повишаване концентрацията на ALP след направената овариектомията в групите GI, GII и GIII в сравнение с контролната група GIV (**Фигура 14**). Подобен ефект отчитат и

други автори с идентичен експеримент върху OVX плъхове, и при отчитането на резултатите при хора с проявена остеопороза. Това е следствие от засилената остеобластна диференциация при остеопорозата причинена от липсата на естрогените. Организмът компенсира костната загуба чрез засилване на костното изграждане. След прилагане на полимерните матрици активността на ALP продължава да бъде висока в сравнение с SHAM групата (**Фигура 14**). Интересно е, че активността ѝ намалява в ГII (групата на животните третирани с PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ + ND) в сравнение с GI и GIII групите (**Фигура 14**). Резултатът се дължи на възстановената костна структура и добра минерализация, формирането на достатъчен брой остеоцити и забавяне на скоростта на ремоделирането (**Фигура 18 А и В**). Подобни ефекти отбелязват и други автори след прилагане на различни медикаменти и наноматериали съчетани с медикаменти, които подобряват процесите на костното формиране и забавят костното ремоделиране, което намалява активността на ALP.

- **ММР-9, ММР-13 и ТИМР-1, като маркери за костната резорбция**

Ролята на ММР-9 и ММР-13 при остеопорозата е установена чрез измерване на серумните им концентрации. Резултатите от нашето проучване показват, че активността на ММР-9 и ММР-13 сигнификантно са увеличава след направената овариектомия в групата GIII в сравнение с контролната група GIV (**Фигури 15 и 16**). Отговорът се крие в хронична естрогенна недостатъчност, която отключва порочен кръг на стимулираната остеокластогенезата чрез производството на про-остеокластогенни цитокини: TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ и IL-4, RANKL и намаляване на експресията на OPG. Експресията на RANKL играе централна роля в патогенезата на остеопорозата. В индуцирането на процеса се включват всички подкласове на пролиферативните Т-клетки (CD8 и CD4, Th (helper) 1 и Th2 клетки) и В-клетъчната линия (В-

клетъчни прекурсори и зрели В-клетки). Това е причина, че днес много често се говори за остеопороза не само като възпалително, но и аутоимунно заболяване. Ендокринният дисбаланс формира локален самоподдържащ възпалителен процес в костната тъкан, който води до постоянно производство на MMPs.

Остеобластите са таргетните клетки при липсата на естрогени и освобождават различни матриксни металопротеинази, (включително MMP-13), които са отговорни за остеокластната костна резорбция.

MMP-9 е агресивен фактор не само при остеопорозата. Високите му серумни нива се доказват при много патологични процеси. Например, при онкологичните заболявания се откриват високи тъканни и серумни нива на MMP-9 и TIMP-1. Артритните заболявания, кардиоваскуларните заболявания, като хипертоничната болест, атеросклероза, артериалната ригидност също протичат с високи серумни нива на MMP-9.

MMP-13 е ключов фактор за активиране на други MMPs и е в състояние да разруши остеоида, покриващ повърхността на костните трабекул. MMP-13 инициира ремоделирането на костите при мишки, плъхове и хората с което улеснява адхезията на остеокластите към минерализирания матрикс. Освен това се предполага, че фрагментираният колаген от действието на колагеназата също е в състояние да активира остеокластите. MMP-13 разгражда колаген тип I в костния матрикс заедно с MMP-9 и катепсин К. Те и съдовия ендотелен растежен фактор са ключови регулатори за ремоделирането на скелетната тъкан. Експериментално върху плъхове беше доказано, че 17- β -естрадиолът може да инхибира експресията на MMP-13 в остеобластните клетки. Следователно, естрогенната недостатъчност води до свръхекспресията на MMP-13. MMP-13 медира остеокластната резорбция под контрола на паратиреоидния хормон. Опити върху OVX плъхове са установили, че експресията на MMP-13 се увеличава и значително корелира с костната

резорбция. Подобен резултат получихме и ние в хода на нашия експеримент.

Естрогенният дефицит водещ до свръхекспресията на MMP-9 и MMP-13 е пряко свързан с патогенезата на постменопаузалната остеопорозата чрез локалното възпаление и оксидативния стрес.

TIMP-1 е фактор който контролира активността на всички MMPs освен MMP-1, като по този начин ограничава протеолизата на ЕЦМ. Експериментално върху миши модели е доказано, че TIMP-1 има способността да намали разграждането на извънклетъчния матрикс, както при здравата тъкан, така и при патологични състояния. Високите стойности на TIMPs винаги се отчитат при различни патологични състояния протичащи с повишена активност на MMPs.

Следователно активният деструктивен процес в костите ще се отрази върху серумните концентрации на MMP-9, MMP-13 и TIMP-1. Ние установихме, че серумните концентрации на MMP-9, MMP-13 и TIMP-1 са по-високи в GIII в сравнение с GIV (**Фигури 15, 16 и 17**). Най значимо увеличение на серумните нива в GIII показва MMP-9 ($p < 0.001$), следвана от MMP-13 ($p < 0.05$) въпреки увеличените стойности и на TIMP-1 (**Фигури 15, 16 и 17**). Това потвърждава тезата, че матриксните металопротеинази при оваректомирани плъхове играят важна роля в развитието на остеопорозата. От тях MMP-9 е с проявено патогенетично значение при костната резорбция може да служи като маркер за остеокластната активност при естрогендефицитната остеопорозата.

Серумните нива на MMPs се повишават при различни патологични състояния свързани с деструкция на ЕЦМ. Допускаме, че *съвкупността от промени в организма, дължащи се на липса на яйчникова функция, и наличие на високи серумни нива на MMP-9 може да служи като рисков фактор за развитието на остеопороза.*

ИХХ изследване на MMP-9 и -13 при експерименталните групи

Събраната информация от експериментални модели при мишки с блокирани гени за MMPs, сочат, че функционалното значение на тези ензими има значение при множество физиологични и патологични процеси. MMPs регулират тъканната и клетъчната хомеостаза, както и имунитета. Следователно, както тяхната липса така и тяхната неконтролираната активност е пагубна за организма. Въпреки, че генната експресия се регулира на транскрипционно ниво, пост-транскрипционният контрол на мРНК се осъществява от цитокини, азотен оксид или микро-РНК. Доказано е, че експресията на MMP-2, MMP-9 и MMP-13 се определя от стабилността на техните мРНКи. Секретираните MMPs често са асоциирани с клетъчната мембрана, което фокусира тяхната активност към специфични субстрати в перичелуларното пространство. Клетките чрез повърхностните си рецептори, като интегрини, сигнализират какъв е протеинът, който ще бъде атакуван и следователно, какъв тип MMPs е необходим и къде трябва да бъде освободен. MMPs се освобождават като неактивни про-форми (зимогени) съдържащи про-домен, който трябва да бъде отстранен за да бъде активирана съответна MMP.

MMP-9 се експресира от съединителнотъканни и провъзпалителни клетки като остеокласти, фибробласти, ендотелни клетки, макрофаги, неутрофили, лимфоцити и др. Ние установихме изразена експресия на MMP-9 в остеокластите и в мононуклеарните клетки при ГІІІ в сравнение с ГІІІІ (**Фигура 20**). При разглеждане на ИХХ препарати лесно се забелязват големи многоядрени остеокласти върху резорбционна повърхност и в костномозъчното пространство оцветени за MMP-9 (**Фигура 20**). Използването на PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ в ГІ и PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀, натоварен с нанодиаменти в ГІІ сигнификантно намалява експресията на MMP-9 в сравнение с ГІІІ (група с остеопороза, **Фигура 20**). Интересно е, че експресията на MMP-9 сигнификантно намалява в ГІІ

и в сравнение с ГІ (**Фигура 20**). Най-важното е, че при резултатите не беше отчетена статистически значима разлика в експресията на MMP-9 между ГІІ и ГІV (**Фигура 20, Таблица 3**). Получените резултати дават основание да допуснем, че използваните полимерни матрици, съчетани с нанодиаманнти оказват положително влияние върху костната структура чрез намаляване на остеокластната активност, която се изразява със слаба експресията на MMP-9.

MMP-13 в костната тъкан се експресира от остеобластите и остеоцитите. Експресията ѝ се повлияна от широка гама хормони и цитокини, като парат хормона, (показателен за важната роля на MMP-13 в костно развитие), инсулиноподобни растежни фактори I и II, тромбоцитен растежен фактор, трансформиращ растежен фактор и др. Ние установихме, че ИХХ експресия на MMP-13 се увеличи при група с ГІІІ в сравнение с ГІV (**Фигура 21**). При разглеждане на ИХХ препарати се забелязват оцветени, безядрени и малки по размер остеобласти, локализирани по повърхността на костните гредички и остеоцити локализирани във вътрешността на трабекуларната гредичка (**Фигура 21**). Интересно е, че използването на полимери и полимери натоварени с нанодиаманнти отново сигнификантно намалява експресията на MMP-13 както в ГІ, така и в ГІІ в сравнение с ГІІІ (**Фигура 21, Таблица 4**). Не съществува статистически значима разлика в експресията на ензима в групите ГІ и ГІІ в сравнение с ГІV. Получените резултати дават основание да твърдим, че използваните полимери, и най-вече PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ натоварен с нанодиаманнти оказват положително влияние върху костната структура.

Намалената експресия на MMP-9 и -13 в ГІ, но по-значително в ГІІ най-вероятно се дължи на локалния противовъзпалителен ефект на наноматериалите. Потискане на възпалението създава условия за костната регенерация. Прилагането на PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀₊ ND в ГІІ едновременно увеличи костното изграждане и намали костната резорбция.

Това възстанови баланса в костния метаболизъм в полза на образуването на нова и здрава кост.

Интересът към инхибирането на MMPs е актуален проблем, тъй като те са активно въввлечени в патогенезата на много заболявания свързани с разрушаването на ЕЦМ и клетъчната миграция. Прилагането на бифосфонати, като основен терапевтичен метод при лечение на остеопорозата, включва намаляване активността на редица MMPs, включително и на MMP-9 и -13 .

Днес се синтезират различни селективни и широкоспектърните синтетични MMPs инхибитори, които още не са преминали успешно клиничните изпитания. ***В нашите експерименти доказахме, че приложените PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀, съдържащи нанодиаманнти се проявяват като локални инхибитори на MMP-9 и -13, което е от изключително важно значение, защото възпалителният процес е в основата на усложненията, наблюдавани след прилагането на импланти при болните с остеопорозата.***

ИХХ изследване на SPARC И COL-1 при експерименталните групи

Процесът на минерализацията се извършва непрекъснато между колагеновите влакна в костната тъкан, а SPARC един от неколагенови протеини, който активно участва в този процес.

Деструкцията на колагеновите влакна е неразделна част от костното ремоделиране, която при нормални условия бързо се заменя от новосинтезирания колаген. При естрогенен дефицит активността на остеобластите и съответно продукцията на колаген тип I се забавя, което води до намалено и още по важно нехомогенно разпределение на колагена. SPARC играе ключова роля в регулирането на костното ремоделиране и поддържане на костна маса. SPARC усилва остеобластната диференциация и потиска адипогенезата. Остеобластите и адипоцитите се диференцират

от общ за тях мезенхимален прекурсор, което и обяснява мастна дегенерация при ниски стойности на SPARC .

Ние установихме, че експресията на SPARC и COL-1 сигнификантно са намалени след естрогенен дефицит в групата с остеопорозата спрямо SHAM групата (**Фигури 22 и 23**). Резултатът беше очакван тъй като липсата на естрогени блокира остеобластната диференциация и пролиферация, което намалява техните секреторни възможности. Прилагането на PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ повишава експресията на SPARC и COL-1 в Г1 спрямо ГIII (**Фигури 22 и 23**). Интересно е, че SPARC показва статистически значима разликата с ГIV, а в експресията на COL-1 няма статистически значима разликата между Г1 и ГIV. Прилагането на PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀, съчетано с нанодиаменти сигнификантно увеличава експресията на SPARC и COL-1 в ГII спрямо ГIII, без да се отчитат сигнификантни разлики в експресията и на двата показателя между ГII и ГIV (**Фигури 22 и 23, Таблици 5 и 6**). Също така се установи, че експресията на SPARC е значително по слаба в ГI в сравнение с ГII (**Фигура 22**).

Получените резултати отново потвърждават, че PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀, съдържащи нанодиаменти оказват влияние върху костната структура. Те, стимулирайки остеобластната диференциация и пролиферация, увеличават експресията на COL-1 и на SPARC в костния матрикс. Вече продуцирания SPARC, се свързва с колагена, синтезиран от Об и инициира минерализацията. В подкрепа на тази теория са и промените в стойностите на серумната ALP в ГII (**Фигура 14**). Нашите резултати показват, че стимулираната експресия на COL-1 и SPARC под влиянието на PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ + ND спира развитието на остеопорозата.

Alghamdi H. S. и съавт., 2014, демонстрират, че използването на костни импланти съдържащи наноматериали повишава устойчивостта на

костта, което отново се дължи на възстановяването на костната архитектура. Експериментално е доказано, че различни наноматериали могат да повишат диференциацията на стволовите клетки, което е от изключително значение не само за лечение на остеопорозата, но и при скелетна реконструкция на големи костни дефекти, причинени от травма, инфекция, туморни резекции и скелетни аномалии.

Положителният ефект при прилагане на полимерни матрици, натоварени с различни наноматериали, върху костната тъкан намират и други учени при лечението на остеопорозата или други тъканни дефекти. Според Barry M. и съавт., 2016 включването на различни наноматериали като метод на лечение е добър, тъй като самата кост е нанокомпозит. Приликата им с костната тъкан е свързана с това, че те увеличават костната повърхност и грапавина, като по този начин подпомагат адсорбцията и биоактивността на новообразуваните протеини и клетки. Различни биоактивните наночастици притежават голям потенциал в стимулирането на костния растеж, с което компенсират повишената костна резорбцията, наблюдавана при остеопорозата.

При нашите експерименти ние имахме за **цел** първо да моделираме процеса на остеопороза след извършване на овариектомия. С помощта на серумните маркери, имунохистохимични и хистологични изследвания доказахме, че естрогенния дефицит води до остеопороза. Използването на MMPs и TIMP-1, като серумни маркери при остеопорозата не е навлязло широко в клиничната практика. Вероятно проблемът е свързан с това, че стимулът за тяхната продукция може да бъде и остро или хронично възпаление, следователно маркерът няма да бъде високоспецифичен за конкретното заболяване. Но въпреки това световна научна общност акцентира вниманието върху използването на тези ензими като потенциални маркери за развитие на остеопороза.

В нашите експерименти ние изследвахме въздействието на полимерни матрици с/без нанодиаменти върху костната регенерация. Лечението и възстановяването на костен дефект при налична остеопороза зависи от регенераторните възможности на костната тъкан. Скоростта и адекватността на остеобластната диференциация и пролиферация е началната стъпка за възстановяване на костната архитектура. Интраосалното прилагане на PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀ + NDв нашите експериментални групи не само потисна развитието на остеопорозата чрез намаляването на остеокластната активност, но и стимулира костната регенерация (**Фигура 18 А и В**). Това твърдение беше потвърдено чрез *in vivo* сканирането на плъховете третираните с PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀, съдържащи нанодиаменти (**Фигура 10**) и чрез намерената корелациона зависимост на ИХХ показатели в ГІ и ГІІ. И в двете групи се отчете значителна положителна корелация между SPARC и COL-1, като в ГІ ($r=0.519^*$), а в ГІІ ($r=0.556^*$) и положителна висока корелация между MMP-9 и MMP-13 в ГІ ($r=0.868^{**}$) и ГІІ ($r=0.703^{**}$). Ние установихме, че и в двете групи (ГІ и ГІІ) експресията на SPARC и COL-1 се увеличи, а експресията на MMP-9 и MMP-13 се намали (**Фигури 20, 21, 22 и 23**).

Днес основната терапия прилаганата при остеопорозата е насочена към инхибирането на остеокластната активност, например бисфосфонатите, като алендронат, инхибират остеокластната активност и по този начин се спира костната дегенерация. Стимулирането на костния растеж чрез потенцирането на остеобластната функция е основния фокус при разработването на следващото поколение терапии за остеопороза.

Бъдещето на лечението на костната тъкан и лечението на остеопорозата вероятно ще се основава на нови технологии, разчитайки на синергичен подход на комбиниране на елементи в сложно проектирано, имплантируемо скеле, което ще насърчава диференциацията на остеобластите и клетъчна инфилтрация, осигурявайки механична

стабилност на увредената или остеопоротичната кост, докато не се формира нов костен растеж способен да замени увредената тъкан.

Предлаганите от нас полимери $PLGA_{1000}-PEG_{1000}-PLGA_{1000} + ND$, могат да бъдат използвани като потенциални матрици в костното тъканно инженерство. Способността на тези биохибридни полимерни материали да преминават в структура на гел при телесна температура е от изключително значение за запълването на костния дефект.

При остеопороза индивидуалната функция на остеоκластите засенчва тази на остеобластите което води до загуба на трабекуларната маса. В нашите изследвания чрез лабораторни, хистологични и имунохистохимични показатели ние установихме, че $PLGA_{1000}-PEG_{1000}-PLGA_{1000}$ полимери, натоварени с нанодиаманти стимулират костната регенерация и увеличават трабекуларната маса чрез увеличена остеобластна и ослабена остеоκластна активност.

VI. ИЗВОДИ

1. Прилагането на двустранна овариектомия при женски плъхове порода Вистар предизвиква остеопороза, изразена със засилената костна резорбция, доказана с помощта на *in vivo* сканиране на животните и хистологични изследвания.
2. Установява се повишена серумна концентрация на MMP-9, MMP-13 и TIMP-1 в групата OVX спрямо SHAM .
3. Интраосалното приложение на полимерни материали, съдържащи нанодиаменти води до възстановяване на костната структура при плъховете използвани за модел на остеопороза.
4. Доказано е достоверно понижаване на серумната концентрация на ALP в групата животни третирани с полимери, натоварени с нанодиаменти спрямо групата третирана само с полимери.
5. Имунохистохимично изследване на матриксните металлопротеинази MMP-9 и MMP-13 показва следното:
 - Имунохистохимичната локализация на MMP-9 е в остеокластите по резорбционата повърхност на трабекулите и в моноклеарните клетки в костномозъчното пространство, и е повишена в ГIII спрямо останалите групи.
 - Имунохистохимичната локализация на MMP-13 е в остеобластите и остеоцитите и е повишена в ГIII спрямо останалите групи.
 - Налице е положителна корелационна зависимост между MMP-9 и MMP-13 при групите GI, GII, и GIV.

6. Компонентите на костния матрикс остеоонектин (SPARC) и колаген тип I (COL-1) определени чрез имунохистохимично изследване в групите показват, че:
- Имунохистохимичната локализация на SPARC е в остеоцитите и остеобластите и е достоверно понижена при ГIII спрямо ГIV, ГII и ГI.
 - Имунохистохимичната локализация на COL-1 е в остеоцитите, остеобластите и в костния матрикс и е достоверно понижена при ГIII спрямо ГIV, ГII и ГI.
 - Установена е положителна корелационна зависимост между SPARC и COL-1 при групите ГI, ГII, ГIII и ГIV.

VII. ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинално значение:

1. При женски плъхове порода Вистар с развита остеопороза полимерните матрици, натоварени с нанодиаманти значително понижават MMP-9 в остеокласти и MMP-13 в остеобласти и остеоцити, и повишават SPARC и COL-1 в сравнение с групата третирана само с полимерни матрици.
2. Серумната концентрация на ALP се повишава при плъхове с остеопороза, а добавянето на полимерните матрици, натоварени с нанодиаманти я понижават.
3. Интраосалното приложение на полимерни матрици (PLGA₁₀₀₀-PEG₁₀₀₀-PLGA₁₀₀₀), натоварени с нанодиаманти при плъхове с остеопороза води до регенерация на костната тъкан.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Установено е, че серумните концентрации на MMP-9 и MMP-13 се повишават при остеопорозата като маркери за остеокластна активност.
2. Няма достоверни разлики в серумните концентрации на калций, магнезий и фосфор при различните групи експериментални животни.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА

1. Григорян А., К. Костов, В. Дишева, А. Димитрова. „Участие на матриксните металопротеинази в патогенезата на остеопорозата“. Сборник с научни съобщения от конкурсна сесия „Наука и Младост“ МУ- Пловдив (2014):51-56.
2. Григорян А., К. Костов, А. Димитрова. „Роля на матриксните металопротеинази в процеса на костното ремоделиране при естрогенен дефицит“, Science & Technologies. Medicine 4.1 (2014):171-175.
3. Григорян А., А. Димитрова, К. Костов. „Остеопороза и хранителен режим“. Науката за хранене. Варна (2016):126-128.
4. Grigoryan A., A. Dimitrova, K. Kostov, A. Ruseva, M. Atanasova, A. Blazhev, T. Betova, R. Trifonov. „Changes of serum concentrations of alkaline phosphatase and metalloproteinase-9 in an ovariectomized wistar rat model of osteoporosis“. Journal of Biomedical and Clinical Research 10.1 (2017): 32-36.
5. Grigoryan A., A. Dimitrova, K. Kostov, A. Ruseva, M. Atanasova, A. Blazhev, T. Betova. „Serum concentrations of metalloproteinases -9, -13 and TIMP-1 in an ovariectomized wistar rat model of osteoporosis“. Archives of the Balkan Medical Union 52.4 (2017): 391-396.

IX. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА

1. **Григорян А.,** К. Костов, В. Дишева, А. Димитрова. Участие на матриксните металопротеинази в патогенезата на остеопорозата. Конкурс на МНД „Асклепий“ за научно творчество на студенти, докторанти и млади учени. Пловдив 10.04 -12.04.2014 г.
2. **Grigoryan A.,** K. Kostov, A. Dimitrova. 24th International Scientific Conference, Dedicated to the 70-Anniversary of the Foundation of the Union of Scientists in Bulgaria: The role of matrix metalloproteinases in bone remodeling process with estrogen deficiency. Stara Zagora, 5-6 June 2014, Bulgaria.
3. **Григорян А.,** А. Димитрова, К. Костов. Остеопороза и хранителен режим. В: X-ти Национален Конгрес по хранене с международно участие; 2015 май 27-30; Варна. Българско дружество по хранене и диететика; 2015. с.152-153.
4. **Григорян А.,** К. Костов, А. Димитрова, А. Русева, Т. Бетова, М. Апостолова. Промени в серумните концентрации на калций, фосфор, магнезий и алкалната фосфатаза при женски плъхове след интраосално приложение на нови биоактивни хибридни наноматериали. В: XI-ти национален конгрес на Българското дружество по физиологични науки; 2015 окт. 9-11; Пловдив. Пловдив: Folia Medica; 2015. 57 (3) с.50. **SJR 2014=0.172.**
5. **Grigoryan A.,** K. Kostov, A. Dimitrova, T. Betova, M. Apostolova. Expressional changes of endotelin-1, metalloproteinases - 2 and -9 in abdominal aorta in patients with atherosclerosis. В: Anniversary Scientific Conference “Science for Health” - 70 Years Medical University of Plovdiv; Plovdiv. 2015 May 20-22; Plovdiv: Folia Medica; 2015. 57 (1) p. 165. **SJR 2014=0.172.**
6. **Григорян А.,** А. Димитрова, К. Костов, Т. Бетова, М. Апостолова. Имунохистохимично изследване на експресията на MMP-9 при женски плъхове Вистар след интраосално приложение на полимерни матрици. Наука и младост 2016, 12-14 май, Пловдив.
7. **Григорян А.,** А. Димитрова, Т. Бетова, К. Костов, М. Апостолова. Имунохистохимично изследване на експресията на металопротеиназа-13 при женски плъхове Вистар след интраосално приложение на полимерни матрици съдържащи нанодиаменти. XXVI международна

научна конференция на Съюза на учените в Стара Загора. 2-3 юни, 2016 г.

8. **Grigoryan A.**, A. Dimitrova, T. Betova, K. Kostov, M. Apostolova. Expressional changes of matrix metalloproteinases -9 and collagen type 1 in female wistar rats after endosteal application polymer matrices containing nanodiamonds. The 34th Balkan Medical Week, 7-8 October 2016, Bucharest. (Archives of the Balkan Medical Union, Supplement 1, October 2016, T9-P-13, page A76).
9. **Grigoryan A.V.**, K.G. Kostov, A.A. Dimitrova, R.G. Trifonov, T.M. Betova, M.D. Apostolova. Expressional changes of matrix metalloproteinases-9 and-13 in female wistar rats with osteoporosis. XIV International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, 10-15 October, 2016, Medical University-Pleven, Bulgaria (Abstract book, P.23, page 169).
10. **Grigoryan A.**, A. Dimitrova, K. Kostov, M. Atanasova, A. Blagev, T. Betova. Serum concentrations of metalloproteinases -9, -13 and TIMP-1 in an ovariectomized wistar rat model of osteoporosis. The 21st Session of the Balkan Medical Days, Sofia, Bulgaria, 6-8 October 2017 (Archives of the Balkan Medical Union, Volume 52, Supplement 1, October 2017, P20, page A65).
11. Kolibarska M., M. Vielikov, D. Vasilev, T. Ralev, **A. Grigoryan**, A. Dimitrova, K. Kostov. Bone remodeling in pathogenesis of osteoporosis. XV International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, 9-14 October, 2017, Medical University-Pleven, Bulgaria (Abstract book, P.5, page 149).
12. **Grigoryan Armine**, Iliyan Kolev, Anelia Dimitrova, Margarita D. Apostolova. Application of safe-by-design approach for curing osteoporosis – a lock at the future. World Biodiscovery Congress 2017. 17-19 JULY , SOFIA. (BioDiscovery 20 (2017):e15099).
13. **Grigoryan A.**, A. Dimitrova, T. Betova, K. Kostov, M. Apostolova. Polymer matrix containing nanodiamonds as a potential method for treating osteoporosis. World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (WCO-IOF-ESCEO Krakow 2018), 19-22 April 2018, Krakow - Poland (Osteoporosis International 29.4 (2018): P773, page 390).

Х. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ ФИНАНСИРАНИ ОТ МУ ПЛЕВЕН, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- 1. Проект № 12/2014.** Изследване регенерацията на костна тъкан в модел на остеопороза с естрогенен дефицит при женски плъхове Вистар след интракостално приложение на нови биоактивни хибридни наноматериали. Доц. д-р Анелия Александрова Димитрова – ръководител. Участници: доц. Маргарита Димитрова Апостолова, д-р Татяна Маринова Бетова, **д-р Армине Григорян**, д-р Красимир Костов Гинев, Рахила Георгиева Козарова, Милена Крумова Йончева.
- 2. Проект № 5/2016г.** Изследване серумните концентрации на MMP-3, MMP-9 и TIMP-1 в модел на остеопороза с естрогенен дефицит при женски плъхове Вистар след интраосално приложение на нови биоактивни хибридни наноматериали. Доц. д-р Анелия Александрова Димитрова – ръководител. Участници: проф. Маргарита Димитрова Апостолова, д-р Татяна Маринова Бетова, **д-р Армине Григорян**, д-р Красимир Костов Гинев, Александър Божидаров Блажев, Радослав Георгиев Трифонов.
- 3. Проект BG05M2OP001-2.009-0031-C01** „Създаване на център за обучение на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени към Факултет „Медицина" на МУ – Плевен“