**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**
**ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА**
**КАТЕДРА ОРАЛНА И ЛИЦЕВО-ЧЕЛЮСТНА ХИРУРГИЯ**
**Ръководител проф. д-р Р. Угринов, дм, дмн**

---

**Д-р Зорница Господинова Михайлова**

# ЕФЕКТ НА PDGF-BB ВЪРХУ СТВОЛОВОКЛЕТЪЧНИТЕ СВОЙСТВА И ДИФЕРЕНЦИАЦИЯТА НА КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ *in vitro*

**ДИСЕРТАЦИЯ**

**За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“**

**Научна специалност: Орална и лицево-челюстна хирургия**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**
**АКАД. ПРОФ. Д-Р ВАНЬО ИВАНОВ МИТЕВ, ДМ, ДБН**
**ДОЦ. Д-Р ПАВЕЛ КИРИЛОВ СТАНИМИРОВ, ДМ**

**СОФИЯ**
**2017г.**

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

ЕДТА – етилен диамин тетраацетат

ЕСК – ембрионални стволови клетки

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс

ИПСК – индуцирани плурипотентни стволови клетки

ММП – матриксни металопротеинази

МСК – мезенхимни стволови клетки

МСКПДЛ – мезенхимни стволови клетки от периодонтален лигамент

ПДЛ – периодонтален лигамент

РСК – ракови стволови клетки

РФ – растежен фактор

ФТС – фетален телешки серум

СКАЗП – стволови клетки от апикална зъбна папила

СКДФ – стволови клетки от дентален фоликул

СКЗПВЗ – стволови клетки от зъбна пулпа на временен зъб

СКПДЛ – стволови клетки от периодонтален лигамент

СКЗППЗ – стволови клетки от зъбна пулпа на постоянен зъб

ССК – соматични стволови клетки

ТРФ – тромбоцитен растежен фактор

ALP – алкална фосфатаза, alkaline phosphatase

BMP – костен морфогенетичен протеин, bone morphogenetic protein

BSA – телешки серумен албумин, bovine serum albumin

BSP – костен сиалопротеин, bone sialoprotein

CD – клъстър по предназначение, cluster of designation/differentiation

COL1A2 – колаген тип 1a2, collagen type 1a2

COL3A1 – колаген тип 3a1, collagen type 3a1

DAPI – 4’,6-диамидино-2-фенил-индол дихидрохлорид, 4’6-diamino-2-phenyl-indol dihydrochloride

DMEM – хранителна среда на Ийгъл, модифицирана от Дълбеко, Dulbecco's modified Eagle's medium

EGF – епидермален растежен фактор, epidermal growth factor

FACS – клетъчно сортиране чрез флуоресцентно белязване, fluorescent activated cell sorting

FDA – асоциация по храни и лекарства, food and drug association

FGF – фибробластен растежен фактор, fibroblast growth factor

HLA-II – човешки левкоцитен антиген, human leukocyte antigen

HSP47 – топлинно-шоков протеин 47, Heat shock protein 47

IFN – интерферон, interferon

IGF-I – инсулиноподобен растежен фактор I - insulin-like growth factor I

IL – интерлевкин - interleukin

ISCT – международна организация по клетъчна терапия, international society for cellular therapy

ITS – инсулин-трансферин-селен съдържащ етаноламин, insulin-transferin-selenium

LOX – лизил оксидаза, lysyl oxidase

MACS – клетъчно сортиране чрез магнитно белязване, magnetic activated cell sorting

MUP – 4-метил умбелиферил фосфат, 4-Methylumbelliferyl phosphate

PBS – фосфатен буферен разтвор, phosphate buffered saline

PDGF – тромбоцитен растежен фактор, platelet derived growth factor

PI3K – (фосфатидилинозитол-3-киназа), phosphatidylinositol-3-kinase

PRGF – плазма, богата на растежни фактори, plasma rich in growth factors

PRF – богат на тромбоцити фибрин, platelet rich fibrin

PRP – богата на тромбоцити плазма, platelet rich plasma

STAT3 – сигнален трансдуктор и активатор на транскрипцията, signal transducer and activator of transcription 3

SPARC – кисел, богат на цистеин, секретиран протеин, secreted protein acidic and rich in cysteine

TGF – трансформиращ растежен фактор, transforming growth factor

TNF – тумор некротизиращ фактор, tumor necrosis factor

TRIS-HCL – трис-хидрохлорид, tris-hydrochloride

VEGF – съдовоендотелиален растежен фактор, vascular endothelial growth factor

# СЪДЪРЖАНИЕ:

I.ВЪВЕДЕНИЕ.....9
II.ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....12
II.1.СТВОЛОВИ КЛЕТКИ.....12
II.1.2.ВИДОВЕ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ.....12
II.2.МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ.....13
II.2.1.МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВОКЛЕТЪЧНИ МАРКЕРИ.....16
II.3.РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ…….....17
II.3.1.КЛИНИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА РАСТЕЖНИТЕ ФАКТОРИ.....18
II.4.МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ЗЪБНИ ТЪКАНИ.....19
II.4.1.РЕГЕНЕРАТИВЕН ПОТЕНЦИАЛ НА ДЕНТАЛНИТЕ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ.....21
II.5.ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ (ПДЛ).....22
II.5.1.СЪСТАВ НА ПЕРИОДОНТАЛНИЯ ЛИГАМЕНТ.....23
II.5.2.ПРОТЕИНИ, УЧАСТВАЩИ В БИОСИНТЕЗА НА КОЛАГЕН В ПЕРИОДОНЦИУМА.....24
II.5.3.БЪДЕЩИ НАСОКИ ЗА ЛЕЧЕНИЕТО НА ПАРОДОНТАЛНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ.....25
II.6.МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ.....26
II.6.1.ИЗОЛИРАНЕ НА ПЕРИОДОНТАЛНИ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ.....27
II.6.2.КУЛТИВИРАНЕ НА ПЕРИОДОНТАЛНИ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ.....28
II.6.3.ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ.....29
II.6.4.ВЛИЯНИЕ НА РАСТЕЖНИТЕ ФАКТОРИ ВЪРХУ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ.....31

II.6.4.ПРЕДКЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ С МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ.....33
II.6.5.КЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ С МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ.....34
II.7.АВТОЛОЖНИ КРЪВНИ ПРОДУКТИ.....36
II.7.1ФИБРИНОВИ АДХЕЗИВИ.….....36
II.7.2.ТРОМБОЦИТНИ КОНЦЕНТРАТИ (ТК).....37
II.7.2.1.БОГАТА НА ТРОМБОЦИТИ ПЛАЗМА (PLATELET-RICH PLASMA (PRP))…….....…37
II.7.2.2.БОГАТ НА ТРОМБОЦИТИ ФИБРИН (PLATELET-RICH FIBRIN (PRF))…….....…39
II.7.2.3.РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ В ТРОМБОЦИТНИТЕ КОНЦЕНТРАТИ…….....40
II.7.2.4.ВЛИЯНИЕ НА ТРОМБОЦИТНИТЕ КОНЦЕНТРАТИ ВЪРХУ КЛЕТЪЧНАТА ПРОЛИФЕРАЦИЯ, КОЛАГЕНОВИЯ СИНТЕЗ И МИНЕРАЛИЗАЦИЯТА *in vitro*.....41
II.7.2.5.ТРОМБОЦИТНИТЕ КОНЦЕНТРАТИ В КЛИНИЧНИ ЕКСПЕРИМЕНТИ.....43
II.8.ТРОМБОЦИТЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР (PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR – PDGF)…….....45
II.8.1.РЕКОМБИНАНТНА ФОРМА НА ТРОМБОЦИТНИЯ РАСТЕЖЕН ФАКТОР – rhPDGF.....…47
II.8.2.ЕФЕКТ НА ТРОМБОЦИТНИЯ РАСТЕЖЕН ФАКТОР ВЪРХУ КЛЕТЪЧНАТА ПРОЛИФЕРАЦИЯ, СИНТЕЗА НА КОЛАГЕН И МИНЕРАЛИЗАЦИЯТА *in vitro*.....48
II.8.3.ЗНАЧЕНИЕ НА ТРОМБОЦИТНИЯ РАСТЕЖЕН ФАКТОР ЗА ОРАЛНАТА ХИРУРГИЯ.....50
II.9.АНАЛИЗ НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР.....53
СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ.....57
III.ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....57
IV.МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....59

IV.1.МАТЕРИАЛИ.....59
IV.2.МЕТОДИКИ.....63
IV.2.1.ЕКСТРАКЦИЯ НА ТРЕТИ МОЛАРИ, ИЗОЛИРАНЕ, *in vitro* КУЛТИВИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА КЛЕТКИТЕ….....63
IV.2.1.1.ЕКСТРАКЦИЯ НА ТРЕТИ МОЛАРИ И ИЗОЛИРАНЕ НА ПЪРВИЧНА КЛЕТЪЧНА КУЛТУРА ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ.....63
IV.2.1.2.*In vitro* КЛЕТЪЧНО КУЛТИВИРАНЕ.....67
IV.2.1.3.ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ: ИЗСЛЕДВАНЕ ЕКСПРЕСИЯТА НА МАРКЕРИ ПРИ КЛЕТКИТЕ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ.....68
IV.2.1.3.1.ФЛОУЦИТОМЕТРИЧЕН АНАЛИЗ.....68
IV.2.1.3.2.ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ.....72
IV.2.1.3.2.1.ИЗСЛЕДВАНЕ ЕКСПРЕСИЯТА НА ПОВЪРХНОСТНИ МАРКЕРИ.....74
IV.2.1.3.2.2 ИЗСЛЕДВАНЕ ЕКСПРЕСИЯТА НА ВЪТРЕШНОКЛЕТЪЧНИ МАРКЕРИ.....77
IV.2.2.ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА PDGF-BB ВЪРХУ КЛЕТЪЧНИЯ ЦИКЪЛ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ.....79
IV.2.2.1 ИЗСЛЕДВАНЕ ЕФЕКТА НА PDGF-BB ВЪРХУ КЛЕТЪЧНИЯ ЦИКЪЛ.....79
IV.2.2.2 ИЗСЛЕДВАНЕ ЕФЕКТА НА PDGF-BB ВЪРХУ КЛЕТЪЧНАТА ПРОЛИФЕРАЦИЯ.....80
IV.2.3.ФЛОУЦИТОМЕТРИЧЕН АНАЛИЗ НА СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ, КУЛТИВИРАНИ В БЕЗСЕРУМНА СРЕДА С ДОБАВЕН PDGF-BB.....81
IV.2.4.ИЗСЛЕДВАНЕ ЕФЕКТА НА PDGF-BB ВЪРХУ КОЛАГЕНОВИЯ СИНТЕЗ……..….....85
IV.2.4.1.КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТОТАЛНИЯ РАЗТВОРИМ КОЛАГЕН.....85

IV.2.4.2.ИЗСЛЕДВАНЕ АКТИВНОСТТА НА ЛИЗИЛ ОКСИДАЗА (LYSYL OXIDASE - LOX).....87
IV.2.5.ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА PDGF-BB ВЪРХУ ОСТЕОГЕННАТА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ.....89
IV.2.5.1.ИЗСЛЕДВАНЕ НА АЛКАЛНОФОСФАТАЗНАТА (ALKALINE PHOSPHATASE-ALP) – АКТИВНОСТ.....89
IV.2.5.2.ЦИТОХИМИЧНО ОЦВЕТЯВАНЕ НА КАЛЦИЕВИТЕ ОТЛАГАНИЯ С ALIZARIN RED.....91
IV.2.6.СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ.....93

V.РЕЗУЛТАТИ.....94
V.1.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 1.....94
V.2.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 2.....97
V.3.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 3.....104
V.4.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 4.....110
V.5.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 5.....113
V.6.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 6.....121
VI.ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ.....130
VII.ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....160
VIII.ИЗВОДИ……..…….....165
IX.ПРИНОСИ……167
X.БИБЛИОГРАФИЯ.....168
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....202
СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ.....203
БИОГРАФИЧНИ ДАННИ.....204

# I.ВЪВЕДЕНИЕ

Мезенхимните стволови клетки (МСК) представляват мултипотентни стромални клетки, които експресират специфични маркери, делят се многократно, формират колонии и могат да се диференцират до различни клетъчни типове при определени условия. МСК се откриват в съединителната тъкан на много органи. Голяма част от характеристиките на тези клетки са добре описани, но стволовоклетъчните им свойства продължават да бъдат обект на много *in vitro* и *in vivo* експерименти. МСК имат големи регенеративни способности и се считат за важен елемент в развитието на регенеративната медицина. През последните години вниманието е насочено към търсене на възможности за приложение на стволовите клетки при лечението на различни патологични състояния: травми, тумори, дегенеративни заболявания, диабет, дисплазии и т.н.

Рутинното изолиране на стволови клетки от някои органи и тяхното *in vitro* култивиране са ограничени поради морални и етични съображения, както и поради необходимостта от инвазивни процедури за получаване на донорския материал. Зъбните тъкани са лесно достъпен източник на стволови клетки. До момента са изолирани и описани стволови клетки от зъбна пулпа на временни и постоянни зъби, от периодонтален лигамент (ПДЛ), от апикална папила и от зъбен фоликул.

МСК в ПДЛ са клетки, свързани с поддържането на интегритета, функцията и най-вече на регенеративните процеси в периодонциума. МСК от ПДЛ притежават всички характерни особености на стволовите клетки от мезенхимен произход. Могат да се диференцират до различни типове клетки (мезенхимни и немезенхимни) в зависимост от условията на култивиране. Обикновено, изолирането на периодонтални МСК става след рутинна екстракция на интактни трети молари или на премолари по

ортодонтски показания. До момента е известно, че се провеждат предимно *in vitro* и предклинични експерименти с периодонтални стволови клетки. Липсват данни от клинични експерименти с високо ниво на достоверност (Ниво на достоверност А и В). Провеждането на такива клинични експерименти може да се реализира след предварително изпълнение на добре планирани и достатъчно убедителни *in vitro* опити.

Всички процеси в организма протичат строго контролирано от редица активни молекули. Към молекулите с висока биологична активност спадат растежните фактори (РФ). Множество РФ се освобождават от активираните тромбоцити. Значението им за регенеративните процеси води до разработването на автоложни биологични материали, наречени тромбоцитни концентрати (ТК). Търсят се начини за оптимизиране на лечебните методи при различни патологични състояния в лицево-челюстната област именно с участието на ТК и активните молекули в тях. В практиката започват да навлизат и разработени рекомбинантни форми на РФ.

Един от РФ с най-висока биологична активност е тромбоцитният растежен фактор (ТРФ)-Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Той участва в регенерацията на меките тъкани и костите, стимулира пролиферацията и химиотаксиса на много типове клетки. Учени правят опити да въведат неговата рекомбинантна форма в оралната и лицево-челюстната хирургия за лечебни цели. Все още, обаче ефектите на PDGF върху отделните биологични процеси в клетките не са напълно изследвани. Механизмите, по които се реализира неговата активност върху стволовите клетки от зъбен произход не са проучени към момента.

Характеризирането на стволовите клетки от зъбен произход и детайлното изследване на ефектите, които РФ оказват върху тях, ще доведе до разработването на нови терапевтични методики за лечение на хирургичните заболявания в лицево-челюстната област. Преди да стане

възможно рутинното им използване в клиниката, трябва да бъдат проведени редица *in vitro* експерименти, които да предоставят информация за точните им механизми на действие.

# II.ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

## II.1.СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Стволовите клетки представляват недиференциран клетъчен вид, който се характеризира със способност да образува колонии, да се самообновява (неограничена пролиферация и поддържане на клетъчната линия) и да се диференцира до различни клетъчни типове (7,33,44,48).

### II.1.2.ВИДОВЕ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Стволовите клетки биват ембрионални стволови клетки (ЕСК), соматични стволови клетки (ССК) („зрели" или стволови клетки на възрастния организъм) и индуцирани плурипотентни стволови клетки (ИПСК) (134). ЕСК са плурипотентни и са получени от вътрешната клетъчна маса или бластоциста (279). Те могат да се превърнат в клетки от трите зародишни листа (екто-, ендо- и мезодерма) и теоретично могат да пролиферират неограничено без да се диференцират (279). Терминът „ембрионални стволови клетки" е предложен, за да бъде възможно отдиференцирането на ембрионалните плурипотентни стволови клетки от тези, които произлизат от тератокарциноми (187). През 1981г за първи път се изолират ЕСК от вътрешната част на бластоцист (187). В резултат от етични съображения работата с този клетъчен тип днес е силно ограничена (130,134).

Напоследък в литературата все по-често се откриват данни за ИПСК (298). Те се получават чрез генни модификации и клетъчно репрограмиране на соматични клетъчни типове (274). Подобно на ЕСК, те са способни да се диференцират до клетки от трите зародишеви листа – ендо-, екто- и мезодерм (102,163). Генните модификации, чрез които са получени ИПСК повишават риска от неконтролируем клетъчен растеж и

пролиферация, както и от ограничен потенциал за пълноценно участие в тъканнорегенеративните процеси (204,236).

Прилагането на ЕСК и ИПСК за лечебни цели крие опасност от развитие на неопластични процеси (48,163). Провеждането на *in vitro* и предклинични експерименти с тяхно участие може да даде отговори на много въпроси, които се отнасят до ефекта на различни активни молекули (вкл. и РФ) и противотуморни агенти върху тези клетъчни типове (48).

ССК на възрастния организъм остават включени измежду други диференцирани клетки в тъканите (46,66,85,234). Те притежават по-ограничен диференциационен потенциал от ембрионалните (134). Обикновено се очаква ССК да поемат пътя на диференциация към клетки, идентични с тези на тъканите, от които произхождат (102). Редица проучвания напоследък докладват способността им да се диференцират и до клетки с различна тъканна принадлежност (44,199). Вероятно основна роля тук имат конкретните условия на средата, в която е култивирана клетъчната линия (33,137).

През последните 20 години все по-често се коментират т.нар. ракови стволови клетки (РСК) (219). Те притежават качества, по които наподобяват нормалните стволови клетки, като способност да се самообновяват и да се диференцират до различни туморни клетъчни подтипове (9,105,219). РСК са способни да инициират и да стимулират туморния растеж и развитието на метастази (154,308). Напоследък се търсят нови методи за лечение на неоплазми чрез повлияване функциите на РСК (67,219).

## II.2.МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Първите данни в литературата относно наличието на стволови клетки в тъканите датират от преди повече от 50 години. През 1964г. Till и McCulloch изследват клетки от миши костен мозък, които запазват

способността си да се самообновяват и да образуват колонии след радиационно облъчване (196). По-късно Friedenstein (106) доказва наличието на малка популация от прекурсорни клетки в костния мозък, различна от хематопоетичната. Авторът установява способността им да инициират атопично образуване на кост. Те представляват малки фибробластоподобни клетки, които могат да адхезират към пластмасови и други повърхности (216). Caplan (62) им дава наименованието мезенхимни стволови клетки (МСК) въз основа на това, че произхождат от стволовоклетъчни ниши в органи с мезенхимен произход. Освен МСК, известни са още хематопоетични стволови клетки, еднотелиални стволови клетки и др. (43,283).

Първите подробно характеризирани МСК са получени от костен мозък (107). В последствие са докладвани характеристиките на стволови клетки с различна органна принадлежност – от плацента (136), кръв (128), мастна тъкан (323), гингива и кожа (58,202) и др. Освен от човек, МСК са изолирани от много животински видове: мишки (187,274), свине (174,260), маймуни (143) и др.

През 1999г. Pittenger (234) изолира и култивира човешки МСК от костен мозък на илиачна кост. Авторът демонстрира тяхната способност да се диференцират до остеогенни, адипогенни и хондрогенни типове. В последствие се появяват и други данни в литературата, които доказват мултипотентността на тези клетки и потенциалът им да се диференцират дори до клетъчни линии, различни от мезенхимните (235). До момента най-много научни доклади описват свойствата на костномозъчните МСК. Това е причина те често да се включват в експериментални постановки като контролна група (29,173,250).

Освен, че притежават всички стволовоклетъчни свойства, МСК са способни да повлияват имунния отговор (11,66). Установено е, че могат да инхибират продукцията на проинфламаторни цитокини като тумор

некрозиращ фактор алфа (tumor necrosis factor-α - TNF-α) и интерферон гама(interferon-γ - IFN-γ), а от друга страна увеличават синтеза на анти-инфламаторни цитокини – интерлевкини-4, -10 (interleukin - IL-4, IL-10) (11). Според автори, МСК могат да се прилагат в огранната трансплантация, където стимулират процеса на инкорпориране на донорския материал в рецепиента (34). Вече има проведени клинични експерименти с използването на МСК с цел инхибиране на лимфоцитната пролиферация и елиминиране на риска от реакция на реципиента към трансплантата (161).

МСК са много податливи на генна модификация (209). Те могат да играят ролята на носители на специфични гени и да оформят депа от противотуморни агенти в самите тумори (264,268).

Характеристиките, които МСК притежават определят ролята им в развитието на клетъчната регенеративна терапия (132,305,315). Това би дало възможност за разработване на нови щадящи подходи при лечението на различни вродени, дегенеративни заболявания, травми и тумори (33,48,137). Резултатите от клинични проучвания с МСК са в начален етап на развитие и е необходимо да бъдат подкрепени от още експерименти с участие на достатъчен брой пациенти (7). Липсва достатъчно информация в литературата относно факторите и механизмите, отговорни за фенотипната изява на свойствата на МСК, както и за реакцията на тези клетки към различни сигнални молекули в средата (33). Важно условие за успеха на регенеративната стволовоклетъчна терапия е създаването на оптимални условията за *in vitro* култивиране на МСК преди клиничното им приложение (44,231). Тези условия трябва да елиминират риска от неконтролируема клетъчна пролиферация и неправилна клетъчна диференциация след имплантирането на стволовите клетки (247). Много изследвания са насочени към ефекта на различни активни молекули върху

пролиферацията, диференциацията и процесите на синтез в МСК (66,173,241,247,307).

### II.2.1.МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВОКЛЕТЪЧНИ МАРКЕРИ

Въвеждането на МСК в клиниката изисква подробно познаване на различните нива на функционална регулация – от тяхната генна експресия до производството на протеини и експресия на маркери (73). Изолираните мезенхимни клетки представляват хетерогенна клетъчна култура, в която те се различават по морфология, пролиферативен и диференциационен потенциал, експресия на повърхностни антигени (231). Докладвани са много повърхностни и вътрешноклетъчни маркери, служещи за характеризиране на клетките и доказване на техния стволовоклетъчен фенотип (66,183,217). Провеждат се експерименти за откриването на един единствен повърхностен маркер, характерен за всички МСК, но такъв все още не е докладван (1,90).

Международната асоциация по клетъчна терапия (International Society for Cellular Therapy (ISCT)) дефинира минимума от характерни особености/критерии, които МСК трябва да притежават (98,131). Това са: 1. способност на адхезират към повърхности на съдовете за клетъчно култивиране *in vitro*; 2. мултипотентност, т.е. да могат да се диференцират до различни клетъчни типове *in vitro*; 3. да експресират маркери, типични за МСК като CD73, CD90, CD105 и да не експресират маркерите CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79α (98,131). Човешките МСК нормално не експресират, също така хематопоетични и ендотелиални маркери (CD133, CD11) (46,66). Характеризирането на базата на тези клетъчни повърхностни протеини чрез системата CD (cluster of differentiation) е основен етап от научната работа със стволови клетки (322). Много от повърхностните маркери, които служат за характеризиране на МСК се използват за идентифицирането и на РСК (219,290). Това най-често са маркерите CD44, CD90, CD133 и т.н. (197,295).

Голяма част от стволовоклетъчните антигенни маркери могат да бъдат установени върху повърхността на МСК с различен тъканен произход (82,132,181). От друга страна, отделните популации от МСК се различават помежду си по степента на експресия на даден повърхностен антиген (90,217). Това може да се дължи на особености на самата тъкан, от която са изолирани клетките, диференциационния стадий на клетките, метод на изолиране и култивиране, или на индивидуални и видови разлики на донорите на биологичен материал (7,29,141). Поради тези причини характеризирането и сепарирането на клетъчните култури би следвало да се направи на базата на белязането с минимум две различни антитела (181). В противен случай не може да се твърди, че получената клетъчна популация е хомогенна (181).

Разделянето на клетките въз основа на експресията на повърхностни маркери влияе върху „чистотата" на получената клетъчна култура (59). Съществуват различни методи за селектиране на дадени клетки, които експресират таргетни повърхностни антигени. Такива са флуоресцентно активирано клетъчно разделяне (Fluorescent Activated Cell Sorting - FACS) и магнитно активирано клетъчно разделяне (Magnetic Activated Cell Sorting - MACS) (58).

## II.3.РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ

РФ представляват малки белтъчни молекули, които имат относително ниско молекулно тегло: от 6 до 45 kDa (263). Те биват освобождавани най-вече от тромбоцитите под действието на различни сигнали и активатори (15,20,32,71,97). Едни от РФ, които се намират в тромбоцитите с най-висока концентрация са тромбоцитният РФ-platelet-derived growth factor (PDGF), TGF-β, (VEGF), FGF, епидермален РФ - epidermal growth factor (EGF), IGF-1 и др. (97,168). Те се свързват към специфични рецептори по мембраната на прицелните клетки и инициират

вътрешноклетъчна каскада от процеси (263). РФ осигуряват обмен на информация между клетките и ЕЦМ, инициирайки механизмите на ендогенновъзстановителните процеси (159,277). РФ регулират оздравителните процеси (265). В резултат от действието им се наблюдава специфична генна експресия в клетките (292). Много *in vitro* и *in vivo* изследвания демонстрират потенциала на РФ за участие в тъканната регенерация чрез влиянието им върху процеси като химиотаксис, диференциация, пролиферация, синтез на ЕЦМ, минерализация, апоптоза (85,242).

РФ трябва да достигнат бързо до таргетните клетки и рецепторите им, преди да бъдат инактивирани (166,263). Функцията на РФ основно се определя от концентрацията им и от фенотипа на клетките, върху които проявяват ефекта си (70,288).

### II.3.1.КЛИНИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ НА РАСТЕЖНИТЕ ФАКТОРИ

Все повече доклади има относно клиничното приложение на рекомбинантни РФ (60,68,185). Те се използват самостоятелно или в комбинация с тъканни присадки (289). Проблемът при работа с тях идва от факта, че имат кратък полуживот, много бързо се разпространяват към околните тъкани и локалната им концентрация намалява или биват метаболизирани от различни ензими и се инактивират (18, 70,288). В резултат намалява тяхната биоактивност и бионаличност, следователно намалява и способността им за пенетрация в клетката (30).

Провеждат се изследвания, с които да се установи оптималната доза и време на аплициране, различни техники за по-бавно и контролирано освобождаване на РФ в тъканите (277,287). Напредъкът в изследванията върху приложението на РФ в клиниката води до въвеждането на различни материали, които служат като „скеле” или матрица за локалното аплициране на активните молекули (289). Примери за такива синтетични

материали са полигликолова киселина, поли-епсилон-капролактон, полиметилметакрилат, алгинат, желатин, автоложен фибрин и др. (30,70). Основни изисквания към тях е да се адаптират лесно в тъканите, да създават условия за клетъчна колонизация, да не предизвикват имунна реакция и да бъдат евтини (215). В денталната медицина се използват често още депротеинизирана лиофилизирана телешка кост, бета-трикалциев фосфат, метилцелулозни гелове и др. (180,212,214). РФ се поставя в тъканите в комбинация с някой от изброените материали. Така се създава депо за постепенно освобождаване на активните молекули (214).

Рекомбинантните РФ се използват в много области на медицината като зъбната имплантология, ортопедията, спортната медицина, лечение на незарастващи улцери и др. (155,287,289). Въпреки положителните резултати на много от проведените клинични проучвания, все още съществува необходимостта от провеждане на допълнителни *in vitro* експерименти с рекомбинантни РФ. Това ще допринесе за по-голяма предвидимост на крайния резултат от лечението с тях (32,71). В повечето *in vitro* експерименти се подчертава значението на концентрацията на РФ, тъй като тя е от първостепенно значение за биологичните им ефекти (151,195,220,226,253).

## II.4.МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ЗЪБНИ ТЪКАНИ

Няколко различни типа дентални МСК са изолирани и детайлно проучвани до този момент (12). Това са стволови клетки от зъбна пулпа на постоянни зъби (СКЗППЗ), стволови клетки от зъбна пулпа на временни зъби (СКЗПВЗ), стволови клетки от периодонтален лигамент (СКПДЛ), стволови клетки от апикална зъбна папила (СКАЗП) и прогениторни клетки от дентален фоликул (ПКДФ) (12,102,132,157,305). Всички те

притежават характерните качества: способност за самообновяване, за формиране на колонии и мултилинеарна диференциация (102,132).

- СКЗППЗ – изолирани са за първи път от зъбна пулпа на трети молари през 2000г. от Gronthos и кол. (119). Те наподобяват фенотипно костномозъчните МСК (119). Способни са да се диференцират до одонтобластоподобни клетки и да осъществят регенерация на пулпо-дентинов комплекс след имплантирането им в имунокомпрометирани мишки (81).
- СКЗПВЗ – изолират се от зъбна пулпа на временни зъби с напреднала коренова резорбция (4,5,203). Те могат да се диференцират до остеобластоподобни и да инициират образуването на костоподобен матрикс (203,249).
- СКПДЛ – изолирани са за първи път през 2004г. от Seo и кол. (248). Те притежават всички характеристики на стволови клетки и са способни да се диференцират до адипоцити, остеобластоподобни клетки и в имунокомпрометирани мишки формират комплекси подобни на цимент-периодонтален лигамент (248). СКПДЛ биват изолирани от кореновата повърхност на екстрахирани зъби, както и от стените на костната алвеола (248,249). Wang и кол. (296) установяват, че има разлика в диференциационния потенциал на тези клетки. Авторите стигат до заключението, че СКПДЛ, изолирани от стените на костната алвеола могат да доведат до по-добра регенерация на алвеоларна кост, в сравнение с клетки от кореновата повърхност на зъба (296).
- СКАЗП – изолирани са от апикалната част на корените на развиващите се зъби, където се намира растежния орган (261). Притежават висок потенциал за пролиферация и диференциация до одонтобластоподобни клетки, тъй като произхождат от зъбни структури, които са още в ранен стадий на растеж и развитие (87).

- ПКДФ – денталният фоликул представлява сак, който огражда зъбния зародиш до момента на пробива на зъба (42). От него са изолирани прекурсорни клетки, способни да се диференцират до циментобластоподобни, остеобластоподобни, както и до клетки от периодонтален лигамент (207).

### II.4.1РЕГЕНЕРАТИВЕН ПОТЕНЦИАЛ НА ДЕНТАЛНИТЕ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

В последните години се появяват все повече доклади относно възможностите за приложение на дентаните МСК в клиниката (7,247). Клетките, изолирани от зъбни тъкани са хетерогенна клетъчна популация, съдържаща стволови, прогениторни клетки, фибробласти и др. (118,203,260). Това налага предварително изолиране, характеризиране и изследване на тези клетки, целящи предвидимост на резултатите при бъдещото им клинично приложение (261).

Според някои учени денталните МСК формират *de novo* различни тъканни структури (305). СКЗППЗ, СКЗПВЗ и СКАЗП имат потенциал да инициират регенерация на кост, хрущял и пулпо-дентинов комплекс, докато СКПДЛ стимулират образуването и регенерацията на мускулна тъкан, сухожилия и лигаменти (305). Способността на МСК от зъбен произход да участват в регенерацията на костите е основание за включването им в комплексната терапия на екстензивни костни дефекти (122,133). Редица автори изследват техния потенциал да се диференцират до остеобластоподобни клетки и да синтезират костен матрикс (119,248,250,148,170,173,229). Остеогенната диференциация и регенеративният потенциал на клетките могат да бъдат изследвани *in vitro,* след включването на подходящи активни вещества в средата, които индуцират процеси на остеогенеза (119,248,250). Много от учените доказват активна минерализацията в клетъчните култури на базата на оцветяване на клетките с багрила като Alizarin red (119,248). Други

проучвания включват методи като флоуцитометрия за доказването на остеогенна диференциация (250). Добавянето на активни вещества като съдово-ендотелиален растежен фактор-vascular endothelial growth factor (VEGF), фибробластен растежен фактор-fibroblast growth factor (FGF) костен морфогенетичен протеин-bone morphogenetic protein (BMP) и др, в средата на клетъчните култури *in vitro,* влияе върху минерализационните процеси (122,162,170,182). РФ от семейството на BMP имат стимулиращ ефект върху остеогенезата (122,182). В литературата вече има вече и данни и от *in vivo* експерименти, които демонстрират способността на BMP да стимулира костната регенерация при пери-имплантити (229). Изследване, проведен от от Lee и кол. (162) показва, че VEGF стимулира минерализацията на клетки от ПДЛ, докато култивирането им с FGF-2 има инхибиторен ефект върху процеса. Отделните РФ имат различни ефекти върху клетките. Проучвания в тази насока биха допринесли за въвеждането на РФ в клиниката с цел лечение на редица патологични състояния, свързани с деструкция на меки тъкани и резорбция на кост.

Въпреки,че функциите на зъбните МСК са добре описани (12,81,102,119,132), все още данните относно ефекта им при пациенти *in vivo* са оскъдни. Крайната цел на всички изследвания върху МСК е успешното им клинично приложение (305). Постигането ѝ е възможно чрез провеждането на добре планирани експерименти, разкриващи в детайли оптималните условия за пълноценното им функциониране (305).

## II.5.ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ (ПДЛ)

ПДЛ е един от компонентите на пародонта заедно с гингивата, циментът, покриващ корена на зъба и алвеоларната кост (6,35,140,315). ПДЛ представлява специализирана съединителнотъканна структура, локализирана между зъбния корен и алвеоларната кост (6,210). Изпълва

пространство с ширина 0,15-0,38 mm, като най-тясната част е на нивото на средната трета на корена на зъба (210,225).

### II.5.1.СЪСТАВ НА ПЕРИОДОНТАЛНИЯ ЛИГАМЕНТ

ПДЛ се състои от клетки, влакна (основно колагенови) и екстрацелуларен матрикс (ЕЦМ), като сред тях са разположени кръвоносни съдове и нерви (6,52,142).

Клетките в ПДЛ представляват хетерогенна група, съставена от остеобласти и остеокласти (локализирани в периодонталния лигамент, но функционално свързани с костта), фибробласти, епителни остатъци на Malassez, макрофаги, недиференцирани МСК, циментобласти (функционално свързани с кореновия цимент) (41,210). Фибробластите са основен клетъчен тип (42). Те са големи клетки и в цитоплазмата си съдържат множество органели, имат удължена вретеновидна форма и са ориентирани по посока на дължината на лигаментите в периодонциума (42). Функцията на фибробластите е основно свързана с протеинов синтез и секреция (42).

Епителните остатъци на Malassez формират струпвания в близост до кореновия цимент (159,210). Те представляват остатъци от епителното влагалище на Hertwig (Hertwig's epithelial root sheath (HERS)) (159,210).

Недиференцираните мезенхимни клетки в ПДЛ са локализирани периваскуларно (37,69). Смята се, че те могат да се диференцират и да заемат мястото на клетки, засегнати от патологичен процес или клетки, които са поели по пътя на апоптоза (37).

Остеобластите и циментобластите са свързани с минерализираните тъкани на пародонта (210).

Колагенови влакна в периодонциума са подредени в снопчета и изграждат групи от фибри (220). Те осигуряват устойчивост на ПДЛ срещу сили на разтягане и опън (54,166). Основен компонент на ПДЛ е

фибриларният колаген: в най-голямо количество е колаген тип I – около 75%, следван от тип III – приблизително 20% и тип V – 5% (310). Фибриларните типове колаген играят роля на скеле в периодонциума, което допринася за стабилността и интегритета на цялата структура (310). Нефибриларните типове колаген като тип IV, VI, XII, XIV също присъстват в малки количества в ПДЛ (54).

Колагенът формира основните влакна в периодонциума - Шарпеевите; те навлизат с единия си край в цимента на корена, а с другия – в алвеоларната кост (127,210).

Друг вид влакна, които присъстват в ПДЛ са окситалановите (35). Окситалановите влакна спадат към групата на еластичните влакна, към които също така се отнасят еластиновите и елауниновите (225). Последните два типа не се срещат в ПДЛ (210).

В периодонталното пространство се намират още вода, хиалуронова киселина и протеогликани, допринасящи за резистентността срещу сили на компресия (41).

### II.5.2.ПРОТЕИНИ, УЧАСТВАЩИ В БИОСИНТЕЗА НА КОЛАГЕН В ПЕРИОДОНЦИУМА

Колаген тип I е най-разпространеният от всички типове колаген в ПДЛ (310). Молекулата му е хетеродимер и се състои се от две алфа-1 вериги и една алфа-2 верига; има дължина около 300 нм и дебелина 1.5 нм (166). Процесът на биосинтез на колагена е сложен и включва генна транскрипция, посттранслационна модификация на веригите, образуване на проколагенова молекула с тройно-хеликоидна структура, секретирането му в ЕЦМ, ензимна обработка, организиране на колагеновите фибрили и стабилизирането им чрез ковалентни интра- и интермолекулярни връзки (282,309,311). Вътре- и извънклетъчната посттранслационна обработка на колагеновите молекули са определящи по отношение на тяхната

пълноценна структура и функция (166). Тези процеси се регулират от ензими, повечето от които са колагенспецифични (39). Основни ензими, които участват във вътрешноклетъчния синтез на колагена са пролил хидроксилазите, лизил хидроксилазите, топлинно-шоковият протеин (38,39,127,166,276). След образуването на проколагена в клетката, молекулите му се опаковат в апарата на Голджи и се секретират в ЕЦМ (225). Към протеините, които повлияват колагеновата матурация в извънклетъчното пространство спадат остеонектинът или SPARC (кисел, богат на цистеин, секретиран протеин, secreted protein acidic and rich in cysteine) и лизил оксидазите (lysyl oxidase – LOX). SPARC се определя като колаген-свързващ гликопротеин, който допринася за екстрацелуларната колагенова фибрилогенеза (188). LOX е ензим, който катализира образуването на силно реактивоспособни алдехидни групи от лизиновите остатъци в прекурсорите на колагена (84). Алдехидните групи стоят в основата на формирането на множество интра- и интермолекулни кръстосани връзки, стабилизиращи колагеновите фибрили (84,257). LOX ензимите участват не само в продукцията на колаген, но и в редица други процеси (145). Те влияят върху клетъчния химиотаксис, туморогенезата, активността на някои РФ и т.н. (28,177).

### II.5.3.БЪДЕЩИ НАСОКИ ЗА ЛЕЧЕНИЕТО НА ПАРОДОНТАЛНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Възпалителните заболявания на пародонта засягат голяма част от децата и почти всички възрастни, като ангажират основните описани структурни елементи на ПДЛ (174,227). Пародонтитът води до прогресивна загуба на ПДЛ и алвеоларна кост (233). По-голяма част от възрастните (до 85-90%) страдат от пародонтит; при повечето се наблюдава лека или средна по тежест форма, а над 15% от тях биват засегнати от напреднала форма на заболяването (72,233). Това е една от

основните причини за загуба на зъбите и затруднено възстановяване на дъвкателната функция с протезни конструкции (86,159).

Прилагането на конвенционалните методи при лечението на заболяванията на пародонта подобряват състоянието на тъканите донякъде (272). Въпреки това при тези техники, все още липсва възможността за пълна регенерация на резорбираната кост и увредения ПДЛ (272).

Целта на пародонталната регенеративна терапия е да бъде осигурена физиологичната функция на зъбите чрез пълното възстановяване на опорните структури: ПДЛ, алвеоларна кост и коренов цимент (37,72). Оптимален оздравителен процес в тъканите може да се постигне чрез локалното приложение на стволови клетки, в комбинация с различни активни молекули, които да потенцират регенерацията (134,229,315). Използването на ССК, и най-вече тези от зъбен произход, за хирургичното лечение на заболяванията на пародонта може да замести напълно конвенционалните лечебни методики (227,229). Получаването и локалното аплициране на тези клетки не е в конфликт с етичните норми, за разлика от приложението на ЕСК (134). Първи опити за лечението на пародонтални заболявания със стволови клетки, са проведени най-напред с костномозъчни МСК – те били директно трансплантирани в пародонтални костни дефекти (307). Основни недостатъци при изолирането на МСК от костен мозък са необходимостта от провеждането на инвазивни манипулации, болката и травма при аспирирането на биологичният материал (132). Тези усложнения могат да бъдат избегнати посредством прилагането на МСК от зъбен произход за лечебни цели (208).

В световната литература вече има *in vivo* изследвания, проведени върху животни, които доказват високата ефективност от МСКПДЛ, приложени локално за лечение на пародонтални заболявания (86,126,174,208).

## II.6.МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ

Периодонталните МСК са изолирани и описани за първи път през 2004г. от Seo и кол. (248). Екипът от учени доказва стволовоклетъчния фенотип на популацията посредством позитивна експресия на селектирани специфични маркери и способност за мултилинеарна клетъчна диференциация (248). Периодонталните стволови клетки имат типичен само за тях потенциал да формират комплекси от цимент/ПДЛ и да стимулират пародонталната регенерация след трансплантирането им в имунокомпрометиран животински модел (248).

МСКПДЛ са локализирани основно периваскуларно в периодонциума (210). Те имат сходна с перицитите морфология, клетъчен фенотип, както и по способност да образуват капиляроподобни структури *in vitro* (140).

### II.6.1.ИЗОЛИРАНЕ НА ПЕРИОДОНТАЛНИ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

МСКПДЛ се изолират от средната трета на кореновата повърхност на постоянни зъби и от стените на зъбната алвеола (52,69,248,305). Тъканните експлантати се подлагат на обработка с ензимни разтвори до получаване на клетъчна суспензия (52,69,248). Получената суспензия се засява в пластмасови съдове за клетъчно култивиране (52,69,248). Според някои автори клетките, изолирани от корена на зъба и тези от стената на алвеолата имат различен потенциал за пролиферация и диференциация (69).

Периодонтални МСК са изолирани от кореновата повърхност и на временни зъби (142). Има мнения, че те притежават по-добра способност да пролиферират и да се диференцират до остеобласти и адипоцити, в сравнение с изолираните от постоянни зъби (142,254). Според други

автори не се открива разлика в свойствата на МСКПДЛ, изолирани от временни и постоянни зъби (259). По отношение на периодонталните МСК от временни зъби остава неясен въпросът за потенциалната им способност да предизвикат костна резорбция след имплантирането им във витални тъкани (168).

Популации от МСК са получени и от ПДЛ на зъби с пародонтален възпалителен процес (170,173,228). Оказва се, че те имат високи пролиферативни и миграционни възможности, но по-ограничен диференциационен потенциал в сравнение с клетки, изолирани от зъби със здрав пародонт (170). От зъб с тежка форма на пародонтит количествено могат да бъдат изолирани много по-малко витални МСК в сравнение с интактен зъб (69).

### II.6.2.КУЛТИВИРАНЕ НА ПЕРИОДОНТАЛНИ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Способността на МСК да „залепват“ по дъното на пластмасови културелни съдове, позволява детайлното изучаване на морфологията и характеристиките на оформените клетъчни колонии (44,46). Свойството им да адхезират осигурява механичното им сепариране от незалепващите хематопоетични клетки (66,283). Някои хематопоетични клетки също първоначално адхезират към повърхностите на съдове за клетъчно култивиране, но бързо се отделят и остават залепени само фибробластоподобните (66,283).

Получената клетъчна култура от МСК не е хомогенна (62,231). Присъстват още ендотелиални клетки, макрофаги, остеобласти и др., които също имат способността да адхезират (62,231).

МСК се култивират при температура 37$^{o}$C, 5% $CO_2$ и 50% влажност в хранителна среда, богата на глюкоза, соли, незаменими аминокиселини, витамини и микроелементи (11,12,136,146,173,199). Хранителната среда за

*in vitro* култивиране на МСК и всички допълнително включени в нея активни молекули са способни да индуцират определн тип клетъчна диференциация (234).

Към хранителната среда за клетъчно култивиране обикновено се прибавя фетален телешки серум (ФТС), който стимулира пролиферацията и поддържа биологичните процеси в клетките (158,205). Той е продукт от животински произход и продължителното отглеждане на клетките в среда с ФТС е свързано с потенциален риск от развитие на имунни реакции и инфекции (205). Използването на ФТС трябва да се избягва в случаи, когато МСК се култивират и подготвят с цел клинично приложение (137,158). Това кара редица учени да провеждат изследванията си върху МСК в безсерумна среда, в която включват различни заместители на ФТС като инсулин-трасферин-селен (insulin-trasferin-selenium-ITS) (137,139) или тромбоцитни концентрати (ТК) (10,205,256). Всички те стигат до заключението, че клетките могат да осъществяват пълноценно функциите си и в безсерумна среда.

### II.6.3.ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ

Мезенхимните клетки, изолирани от ПДЛ представляват хетерогенна популация, в която количествено преобладава броят на стволовите клетки (248). Характеризирането на клетките и доказването на стволовоклетъчните им свойства се извършва на базата на специфични маркери чрез методи като имунохистохимични оцветявания (69,248), магнитно клетъчно сортиране (58,254) или флоуцитометрия (140). Seo и кол. (248) откриват, че периодонталните МСК експресират два повърхностни мезенхимни стволовоклетъчни маркера: CD146 и STRO-1. CD146 е сред основните маркери за периваскуларни и мултипотентни прогениторни клетки в съединителната тъкан на човека (83). Характерен е още за ендотелиални клетки, гладкомускулни клетки, шванови клетки,

клетки типични за някои неопластични процеси (252). Точната функция на този протеин не е напълно изяснена, но се знае, че има отношение към клетъчната морфология, адхезия, реорганизацията на цитоскелета, миграцията, трансмембранната сигнализация и т.н. (250). Редица изследвания доказват, че действително CD146-позитивните клетъчни популации притежават всички характеристики на МСК (82,146,241). STRO-1 е сред най-често прилаганите повърхностни маркери за характеризиране на дентални МСК (217). Iwasaki и кол. (140) установяват наличието на МСКПДЛ чрез положителна експресия на CD44, CD73, CD90, CD146 и CD166. Chen и кол. (69) характеризират клетките с CD44, CD146 и STRO-1 антитела. Silverio и кол. (254) сепарират клетките на CD105-позитивни и CD105-негативни. Позитивните клетки маркират с CD166 и получават двойно позитивни клетки за стволовоклетъчни маркери. Тъй като периодонталните стволови клетки имат мезенхимен произход, при тях не се установява експресия на хематопоетични маркери – CD14, CD34, CD35 и др. (103,173,254,293).

Стволовоклетъчните свойства на клетките се доказват още чрез способността им да формират колонии и да се диференцират *in vitro* (12,69,228,248,254). Много автори изследват пролиферацията и способността на МСКПДЛ да формират колонии за период средно около 10 дни (от 2-3 дни до 3 седмици) (228,248,254,259,296).

Диференциационният потенциал на периодонталните МСК се изследва след култивирането им с активни вещества, иницииращи процеси на тъканна остеогенеза. Остеогенната диференциация на МСК протича оптимално при наличие на аскорбинова киселина, дексаметазон и бета-глицерофосфат в хранителната среда (12,69,135,144,228,248,254). Според доклади, различни активни молекули и РФ могат да влияят върху минерализацията на клетъчните култури като я стимулират или инхибират (122,147,162,229). Доказано е, че МСКПДЛ могат да се диференцират и до

хондробласти и адипоцити, което потвърждава мултилинеарната им диференциация (228,254,259,296).

Свойствата на МСКПДЛ са пряко зависими от възрастта на донора на биологичен материал (304,315,318). Клетки, получени от по-възрастни пациенти имат минимален потенциал за изява на стволовоклетъчните свойства (315,318). Експресията на стволовоклетъчните маркери като STRO-1 и CD146 също намалява с напредване на възрастта на донорите (304). Понижава се способността на клетките да образуват структури цимент/ПДЛ *in vivo* (165). Тези зависимости имат пряка връзка и с факта, че при пациенти над 41 години започват да се наблюдават по-често заболявания на пародонта (233).

МСКПДЛ притежават високи имуномодулаторни свойства (293,294). Според литературни данни те имат потенциал да инхибират пролиферацията на алогенни Т-клетки чрез повишаване нивата на циклооксигеназа-2 и простагландин-Е2 (86). МСКПДЛ потискат В-клетъчната пролиферация и миграция посредством механизми на междуклетъчна сигнализация и синтез на специфичен протеин за програмирана клетъчна смърт (172). Докладвано е, че МСКПДЛ не предизвикват имунни реакции,тъй като не експресират HLA-II (human leukocyte antigen-човешки левкоцитен антиген) и Т-клетъчни ко-стимулаторни молекули като CD80 и CD86 (86).

### II.6.4.ВЛИЯНИЕ НА РАСТЕЖНИТЕ ФАКТОРИ ВЪРХУ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ

Ефектите на различни РФ върху МСКПДЛ се дискутират в много научни трудове (50,151,169,184,218). Докладвано е, че някои активни молекули стимулират диференциацията им до остео- или фибробластоподобни клетки, докато други са ангажирани с поддържане на клетките недиференцирани (153). Продължително култивиране на МСК в

автокринна среда се асоциира с висок риск от автодиференциране, особено при клетки от по-късни пасажи (8,12). Напоследък интересът на учени е насочен към възможността за задържане на ранни клетъчни пасажи недиференцирани посредством различни активни молекули (285). Успехът от такъв тип експериментална работа ще доведе до забавяне на процеси на клетъчно „стареене“ и понижаване на риска от стволовоклетъчна автодиференциация *in vitro* (285). Автодиференциацията и клетъчното стареене се съпътстват от промяна в експресията на специфични клетъчни маркери. По литературни данни, експресията на Sox-2 и Oct-4 (ядрени маркери на МСК) при клетки от ПДЛ се запазва оптимална до 3-ти пасаж, след което започва да намалява (171). Понижена експресия на стволовоклетъчни маркери е признак на клетъчно стареене и редуцирана диференциационна клетъчна активност.

Всеки РФ може да инициира конкретен тип клетъчна диференциация. BMP-2, BMP-7 и VEGF потенцират остеогенната диференциация и активността им е насочена към регенеративните процеси в костни дефекти (122,162,222). Други РФ стимулират диференциация на клетките до фибробластоподобни. Към тези РФ спада TGF-beta 1 (трансформиращ растежен фактор бета 1) (108,151). Ефектът му върху недиференцирани клетки предизвиква повишена експресия на протеини, типични за фибробластите – колаген тип I, алфа-гладкомускулен актин, периостин (108,151).

Точна оценка на ефективността на всеки РФ се прави след анализ на третирана с него клетъчна култура и сравнението и с контролна група от нетретирани клетки. Ефектът на всеки РФ се изяснява след самостоятелното му приложение върху клетки или в комбинация с други активни молекули (15). Среди за култивиране, съдържащи два и повече РФ са разработени в стремежа да се оцени степента, в която активните молекули взаимно потенцират или инхибират активността си (162,182).

Според доклади от *in vitro* проучвания основен фактор, повлияващ активността на РФ е тяхната концентрация в комбинация с допълнителни фактори на микросредата (температура, влажност, наличие на други активни агенти, чиято концентрация не е уточнена) (122,124,151,171,173,174).

### II.6.4.ПРЕДКЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ С МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ

Проведените до момента *in vitro* проучвания с МСК се разглеждат в контекста на разработването на биологични и минимално инвазивни лечебни техники (273,291). На този етап в литературата се откриват все повече доклади от предклинични експерименти с опитни животни. В много *in vivo* експерименти с животински модели е установено, че трансплантирането на МСКПДЛ в пародонтални дефекти води до много добър лечебен резултат и липса на локални усложнения (86,126,246,260,319).

Установено е, че МСКПДЛ локално създадат оптимални условия за регенерация на пародонта след реплантирането на експулсирани зъби (246). Най-добри клинични резултати са описани при реплантирането на зъба в алвеолата в рамките на не повече от 5 мин. след експулсията му (246). В повечето случаи реплантирането на зъбите става след часове или дни, според времето, в което пациентът търси лекарска помощ (224). През този период все повече клетки в ПДЛ губят виталитета си, което води до компрометиране на резултата от лечението (286). Данни в литературата сочат, че в 73-96% от случаите, експулсираните зъби не се интегрират след реплантирането им в алвеолата (238). Zhou и кол. (319) стимулират изолирани автоложни МСКПДЛ *in vitro* да синтезират собствен ЕЦМ и ги аплицират върху кореновата повърхност на експулсирани зъби. Резултатите демонстрират много добра регенерация на ПДЛ и цимент,

както и високи нива на експресия на колаген тип I, тип III и фибронектин от клетките в регенерираната тъкан.

Голям брой предклинични изследвания с животни доказват, че откритият кюретаж на фуркационни и интердентални пародонтални дефекти в комбинация с прилагане на автоложни стволови клетки от ПДЛ води до изграждане на нова кост, цимент и ПДЛ (148,174,227).

Освен автоложни, локално могат да бъдат аплицирани и алогенни МСКПДЛ. При експеримент, проведен със свине се установява, че те стимулират регенеративните процеси в пародонталните тъкани подобно на автоложните клетки (86). Авторите не съобщават за имунна реакция от страна на реципиента.

Sonoyama и кол. (260) провеждат експеримент, при който имплантират МСКПДЛ и МСКАП в комбинация с желатинова гъба Gelfoam® около дентален имплантат при свине. Зъбната алвеола е обработена след екстракцията, за да бъде отстранен целия ПДЛ. След три месеца е поставена и керамична конструкция. Резултатите от компютърния томограф и от хистологичното изследване демонстрират регенерация на ПДЛ-подобна структура и по-голяма стабилност в зоните, третирани едновременно със стволови клетки и Gelfoam®.

В изследване на Zhao и кол. (317) автоложни МСКПДЛ са използвани за интеграцията на експулсирани зъби в комбинация с автоложни кръвни продукти, богати на тромбоцити. Ефектът на тези автоложни продукти се дължи на големия набор РФ и други активни молекули в тях. Резултатите са отчетени осем седмици постоперативно. Установява се добра регенерация да ПДЛ, липса на възпалителни усложнения и липса на анкилоза.

### II.6.5.КЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ С МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ

В литературата има много оскъдни данни относно приложението на МСКПДЛ в клинични експерименти, проведени с хора. Feng и кол. (103) провеждат ретроспективно изследване, с което установяват ефекта от имплантирането на автоложни клетки, изолирани от ПДЛ върху пародонтални костни лезии. Третираните зъби са общо 16 на брой. Пациентите са проследявани в продължение на 32-72 месеца. При клиничния преглед е установен положителен ефект от МСКПДЛ върху оздравителния процес и върху стабилността на зъбите. Не са наблюдавани усложнения по време на и след лечението на пациентите.

В изследване на Gault и кол. (111) се проследява ефектът от човешки автоложни МСКПДЛ, с които покриват повърхността на дентални имплантати непосредствено преди поставянето им в алвеолата. Клетките са предварително изолирани и култивирани *in vitro*. При имплантатите, чиято повърхност е покрита със стволови клетките е установена много добра остеоинтеграция без усложнения.

Всички известни до момента *in vitro* и *in vivo* доклади относно човешки МСКПДЛ не са достатъчни за въвеждането им в рутинната клинична практика (103,148,318). МСКПДЛ трябва да бъдат предварително изолирани, култивирани и намножени *in vitro*, тъй като клиничното им приложение изисква много голям брой жизнеспособни клетки със стабилен фенотип (7). Важен факт е, че продължителното отглеждане на клетките в *in vitro* условия води до стареене, постепенна загуба на стволовоклетъчните им свойства и ограничава пролиферативния им потенциал (7).

В организма на човека има плеяда от активни молекули, които влияят върху регенеративните процеси и свойствата на МСК. Много от тях са концентрирани в кръвната плазма и в тромбоцитите (225). Това насочва интереса към подробно изследване на механизмите, чрез които тези морфогени повлияват МСКПДЛ. Търсят се нови методи за установяване

начините, по които РФ в средата повлияват процесите на пролиферация, синтез и диференциация на клетките (7).

## II.7.АВТОЛОЖНИ КРЪВНИ ПРОДУКТИ

Няколко вида автоложни биоматериали са получени от човешка кръв. Класифицират се като продукти, които имат високо съдържание на фибриноген и такива, които съдържат голям брой тромбоцити (57).

Основните биоматериали, чийто ефект се дължи на тромбоцитните функции са богатата на тромбоцити плазма-platelet rich plasma (PRP) и богатият на тромбоцити фибрин-platelet rich fibrin (PRF), обединени под наименованието тромбоцитни концентрати (ТК) (65).

### II.7.1.ФИБРИНОВИ АДХЕЗИВИ

Прилагането на продукти, получени от човешка кръв за покриването на рани и за стимулирането на оздравителни процеси датира от преди повече от 40 години (57). Преди да започне използването на ТК в практиката са прилагани фибриновите адхезиви или т.нар. „силъри“ (57). Фибриновият матрикс представлява краен продукт от коагулационната каскада (189). Пръв Bergel (40) през 1909г. докладва качествата на фибрина като помощен биоматериал в хематологията. През 1972г. Matras демонстрира ефекта от аплицирането на фибрин (получен от концентриран фибриноген и фактор XIII) върху процеса на регенерация на човешки нервни влакна (192).

Фибриновите силъри все повече се популяризират в Европа през 80-те години на 20-ти век. С тях се осигурява „запечатването” на раневи повърхности, като по този начин се постига щателна хемостаза и се понижава рискът от развитие на инфекция (109). Силърите се прилагат локално непосредствено след хирургична интервенция (237).

Фибриновият адхезив по начало не съдържа тромбоцити, РФ или цитокини (278). Механичните свойства на получения матрикс зависят от концентрацията на фибриногена, а скоростта на полимеризация – от тази на тромбина (110). Резултатът е получаването на триизмерна мрежа, която може да бъде колонизирана от различни клетъчни типове (230). След около 2 седмици материалът се резорбира напълно от функцията на макрофаги и фибробласти (230).

Фибриновите лепила обикновено са алогенни или автоложни (109,201). Въпреки усъвършенстването на методите на работа с тези продукти, все още стои проблемът с трудния протокол за получаването им (115).

Фибриновите адхезиви намират приложение при профилактиката на постоперативни хематоми, превенция от профузно кървене, особено при пациенти с нарушения в хемостазата, намаляват напрежението при адаптирането на ламба, потенцират оздравиделните процеси след хирургични интервенции и др. (79,115,237). Те не се прилагат при кървене от голям кръвоносен съд (100).

### II.7.2.ТРОМБОЦИТНИ КОНЦЕНТРАТИ (ТК)

Под терминът ТК се разбира автоложен (най-често), плазмен продукт, който има висока концентрация на тромбоцити и активни протеинови молекули (77,206). ТК се прилагат в различни медицински области като тъканното инженерство, хирургията, при лечение на незарастващи улцери, стимулиране на ангиогенезата, лечение с костни присадки и др. (20,21).

ТК са били въведени за първи път в клиниката през миналото десетилетие под наименованието тромбоцитен гел, като заместители на фибриновите адхезиви (301). Двата основни продукта в групата на ТК са PRP и PRF (76,91,97). Те включват в състава си всички активни молекули,

които са локализирани в тромбоцитите; различават се по метод на получаване и по начин на активиране на материала (1,3,92,94,97,190).

### II.7.2.1.БОГАТА НА ТРОМБОЦИТИ ПЛАЗМА (PLATELET-RICH PLASMA (PRP))

PRP е първа генерация ТК. Получава се от приблизително 20-80 ml свежа венозна кръв след центрофугиране и съдържа голям брой тромбоцити – около 1 000 000 за мкл. (300). В литературата има различни протоколи за получаването на PRP от цяла кръв, но всички те са подчинени на няколко основни правила (91,97). Протоколът за получаване на PRP се разделя на две основни стъпки: центрофугиране и активиране (92,190).

PRP се поставя локално в тъканите в комбинация с активатор (16,186). Активаторите (тромбин, калциев хлорид) водят до дегранулация на тромбоцитите и полимеризация на фибрина (16). Течната плазма се превръща в тромбоцитен гел и се реализира освобождаването на РФ (24,186).

Нормалният брой тромбоцити при човека е в границите 150 000 до 450 000 клетки в мкл кръв (6,200). Количеството на РФ в ТК зависи от броя тромбоцити (300). В зависимост от индивидуалните особености на пациента, както и според приложения протокол, тромбоцитният брой в PRP може да варира. Възможно е броят на тромбоцитите да бъде от 2-3 до около 5 пъти над физиологичните нива (141). ТК с по-ниски нива на тромбоцити имат субоптимална биологична активност, докато прекалено високите нива на тромбоцити, респ. на РФ могат да инхибират концентрационно различни клетъчни процеси (299).

PRP е автоложен биоматериал и при използването му не се наблюдават реакции като токсичност или имуногенност (179,191). PRP

стимулира неспицифичния имунен отговор поради белите кръвни клетки, които съдържа и синтезираните от тях интерлевкини (303).

При някои пациенти вземането на автоложна кръв за получаване на ТК е контраинидицирано. Това се отнася до състояния като хемофилия, други коагулопатии, антикоагулантна терапия (258). В такива случаи може да се приложи алогенна PRP, за да се избегнат усложнения, свързани със системното заболяване на пациента (27,258). Според Marx (190) вземането на алогенна кръв за приготвяне на PRP се асоциира с непредвидимост на лечебния резултат. По мнение на автора PRP винаги трябва да бъде автоложна.

Докладвани са резултати от *in vitro* изследвания, които доказват позитивен ефект от PRP върху диференциацията и най-вече върху пролиферацията на фибробласти (152), остеобласти (80), мезенхимни клетки от костен мозък (26), клетки от ПДЛ (147,221) и др. Съществуват и доклади, които не са в подкрепа на ефекта на PRP върху биологичните процеси (65,256). Мненията на авторите са противоречиви. Вероятни причини за това са разликите в използваните протоколи, донорите на биологичен материал, възможността активните молекули от тромбоцитите да се инактивират в хранителната среда, без да мога да повлияят клетъчните процеси и т.н. (211)

### II.7.2.2.БОГАТ НА ТРОМБОЦИТИ ФИБРИН (PLATELET-RICH FIBRIN (PRF))

PRF представлява втора генерация ТК (76,93). Този продукт е бил предложен за първи път във Франция през 2001г. във връзка с ограниченията относно реплантирането на кръвни продукти след биохимичната им обработка (76). PRF е описан като фибринов биоматериал, богат на тромбоцити и левкоцити (92,94). Получава се чрез

опростен метод, без добавянето на антикоагулант и субстанции като телешки тромбин, калциев хлорид и други активатори (92).

Тромбоцитната активация и фибриновата полимеризация в този случай протичат по естествен път. Тромбоцитите се активират в резултат от контакта им със стените на стъклената епруветка, в която е поставен PRF (178). Бързо получената гъста фибринова мрежа задържа РФ за по-дълго време и ги предпазва от протеолиза (178).

Изследвания, изясняващи състава на PRF демонстрират високо съдържание на РФ, както и на много имунни цитокини – IL-1β, IL-6, IL-4, TNF (тумор некрозиращ фактор) (94). Следователно PRF може да се аплицира локално при наличие на възпалителен процес и да стимулира защитните механизми в тъканите (3,94).

PRF се оформя във вид на плътна фибринова мембрана след като се притисне между стерилни марли (262). Тази мембрана освобождава бавно, в рамките на няколко дни съдържащите се в нея РФ, цитокини, както и матриксни протеини – тромбоспондин, фибронектин, витронектин и др. (95). Според проучвания на Burnouf (56) и Su (271) количеството на РФ в мембраната намалява след притискането ѝ с марли, заради механичното увреждане на голям брой тромбоцити. За да се избегне нарушаването на тромбоцитния интегритет, мембраната може да бъде оформена посредством устойство наречено PRF-компресор (150). С него се получава мембрана с дебелина 1 mm (150).

Различни изследвания докладват възможностите за употребата на PRF в области като лицево-челюстната хирургия (2,76,77,88), пластичната хирургия (53), оториноларингологията (75) и т.н. *In vitro* експерименти доказват позитивното му влияние върху пролиферацията и диференциацията на клетъчни култури: гингивални фибробласти, прекератиноцити, преадипоцити и остеобласти (96).

### II.7.2.3.РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ В ТРОМБОЦИТНИТЕ КОНЦЕНТРАТИ

Ефектите на ТК се дължат на високото съдържание на тромбоцити и най-вече на активните молекули в тях (24,25,95). Концентрацията на тромбоцити се определя от количеството кръв, взета от донора, протоколът за получаване на ТК, използвания активатор, индивидуални особености на пациента (20). Унифицирането на технологията за получаване на ТК и режима на центрофугиране би дало възможност за по-надежден контрол върху концентрацията на тромбоцитите, а от там – и на РФ (19,25). Трудно е да се направи точна количествена оценка на съдържанието на всеки един РФ в ТК (244). Въпреки това много изследвания докладват приблизителните концентрации на най-разпространените морфогени в кръвните продукти (55,269,270,280,300). Авторите предлагат следните стойности, измерени в ng/ml: PDGF-AB – 50-300, PDGF-AA – 1-10, PDGF-BB – 10-30, TGF-beta1 – 50-300, TGF-beta2 – 0.5, VEGF – 5-20, EGF – 0.5-20, IGF – 50-200. Тези концентрации са установени общо за всички кръвни продукти с изключение на фибриновите лепила. В повечето случаи последните са инертни и не съдържат тромбоцити, но има възможност да бъдат обогатени с клетки и активни молекули (27,79). Така те могат да изпълняват ролята на матрици за биоактивни вещества (115).

Директното изолиране на РФ от ТК и индивидуалното проучване на активността им не е част от рутинната научната работа. Известно е, че при някои пациенти има ясно дефинирани противопоказания за вземане на автоложна кръв за получаването на ТК (27,258). По тези причини, много от научните трудове се концентрират върху изследване ефектите на рекомбинантни биологично активни молекули в *in vitro* (78,182,184,193,220,243) и в клинични експерименти (31,49,198,215,245).

### II.7.2.4.ВЛИЯНИЕ НА ТРОМБОЦИТНИТЕ КОНЦЕНТРАТИ ВЪРХУ КЛЕТЪЧНАТА ПРОЛИФЕРАЦИЯ, КОЛАГЕНОВИЯ СИНТЕЗ И МИНЕРАЛИЗАЦИЯТА *in vitro*

ТК са обект на много *in vitro* експерименти, с които се цели изясняване на активността им по отношение на клетъчна пролиферация, диференциация, протеинов синтез и т.н. (22,176).

Adiwinata и съавт. (10) проучват възможността PRP да замести ксеногенния ФТС в *in vitro* експериментални постановки. Авторите стигат до заключение, че трябва да се дефинира оптималното за клетките процентно съдържание на ТК в хранителната среда. Според тях броят тромбоцити (респ. РФ) в ТК са определящи за поддържане клетъчните функциите.

В изследване, проведено от Annunziata и кол. (22) става ясно, че PRP отключва различни биологични процеси, в зависимост от типа третирани клетки. Авторите докладват, че след култивиране на клетки от ПДЛ с ТК се активират пролиферативните процеси, колагеновата активност и остеогенната диференциация.

Arpornmaeklong и кол. (26) сравняват ефекта на PRP с този на BMP-4 върху пролиферацията и остеогенната диференциация *in vitro*. Резултатите им показват, че ТК има известен дозо-зависим позитивен ефект върху клетъчното делене, но потиска диференциацията на клетките до остеобластоподобни. Според авторите PRP може би влияе по-скоро върху регенерацията на меките тъкани, отколкото на костта.

Друго проучване показва, че PRP стимулира остеогенната диференциация в клетки от ПДЛ, но там ТК е добавен в среда с дексаметазон и ФТС (147). Наличието на дексаметазон и β-глицерофосфат в хранителната среда са достатъчно условие за иницииране на остеогенеза *in vitro*. Авторите получават оптимален резултат след 20-дневно култивиране на клетките в описаните условия. Не става ясно дали процесите на минерализация са предизвикани от ефекта на тромбоцитните РФ върху клетките или по-скоро протичат в резултат на формирана фибринова мрежа.

В литературата има доклади, според които PRP не проявява значим митогенен ефект върху остеобластна култура (256). Okuda и кол. (221) установяват, че PRP може има потенциращ или инхибиторен ефект върху пролиферацията, в зависимост от произхода и фенотипа на самите клетки. Авторите изтъкват значението най-вече на два РФ (PDGF и TGF-бета) за активността на PRP. В заключението си, те подчертават нуждата от допълнителни експерименти, които да конкретизират ефектите на тези два РФ върху клетъчните процеси на пролиферация, синтез и диференциация.

PRF, подобно на PRP е обект на много *in vitro* и клинични експерименти. Choukroun и кол. (75) доказват, че PRF проявява силен митогенен ефект върху изследвани от тях клетъчни култури *in vitro*. Засилената клетъчна пролиферация е един от основните признаци за инициация на тъканната регенерация. Авторите предлагат разработването на нови терапевтични методики с участието на PRF.

Su и кол. (271) доказват, че PRF има по-добри регенеративни свойства от PRP заради консистенцията на материала и бързо оформената гъста фибринова мрежа. Според авторите PRF осигурява локално задържане на активните молекули за по-дълъг период и има по-добри механични свойства. Същите автори изследват количеството РФ в PRF, тъй като биологичните процеси, в които участват активни молекули са концентрационно зависими.

Zhao и кол. (317) изследват ефекта на PRF върху СКПДЛ на кучета *in vitro*. След едноседмично третиране те установяват засилена клетъчна пролиферация. PRF стимулира също колагеновата експресия в клетките, но потиска остеогенната им диференциация. Авторите отчитат количеството на РФ в получения PRF, но не успяват да дефинират ефекта на всеки отделен РФ върху СКПДЛ.

### II.7.2.5.ТРОМБОЦИТНИТЕ КОНЦЕНТРАТИ В КЛИНИЧНИ ЕКСПЕРИМЕНТИ

Клиничното приложение на ТК в оралната хирургия се отнася до лечението на пародонтални дефекти, регенерация на алвеоларната кост след екстракция на зъб, остеоинтеграция на дентални имплантати, направлявана тъканна регенерация и т.н. (2,3,51,281). Първият клиничен експеримент с PRP е проведен от Marx и съавт. (191). Изследването включва лекуване на 88 мандибуларни костни дефекта/алвеоли, получени след екстракция на зъб. Част от тях са третирани само с автоложна костна присадка, а другите – с автоложна кост и PRP в комбинация. Резултатът демонстрира, че PRP потенцира костната регенерация.

Albanese и кол. (13) правят подробен преглед на различни доклади, свързани с приложението на PRP в екстракционна рана, при поставяне на дентални имплантати, синус-лифт, лечение на пародонтални лезии и медикаментозно индуцирана остеонекроза. Авторите стигат до заключението, че PRP оптимизира условията, в които протича оздравителния процес най-вече в първите дни след след хирургична интервенция. Според авторите ефектът на ТК върху остеоинтеграцията на имплантати и при лечение на пародонтални лезии е по-добър, когато материалът е в комбинация с тъканна присадка. Според същите автори е необходимо да се планират и проведат още много експерименти (*in vitro* и *in vivo*), които да подкрепят ползата от приложението на ТК и индивидуалната активност на всеки РФ.

Редица изследвания от друга страна показват липса на значим ефект при приложението на ТК върху оздравителния процес след дентални хирургични интервенции (64,120). Casati и съавт. (63) съобщават, че самостоятелното аплициране на PRP за лечението на костни дефекти около дентални имплантати, не засилва регенерацията на тъканите в сравнение с контрола. Според Navneet и съавт. (211) липсата на значим позитивен

ефект на ТК в много изследвания се дължи на липса на стандартизиран протокол за приготвянето му. Авторите изтъкват необходимостта от предварително измерване на тромбоцитния брой както във взетата от пациента кръв, така и в крайния продукт.

Докладвани са резултати от *in vivo* експерименти, при които ТК се аплицира локално в комбинация със стволови клетки. Yamada и кол. (307) успяват да имплантират МСК, изолирани от илиачна кост заедно с PRP в пародонтални дефекти след открит кюретаж. Авторите установяват, че следоперативния оздравителен процес протича по-пълноценно и без усложнения след прилагане на PRP и стволови клетки в сравнение с контрола.

Според някои доклади добрите клинични резултати от приложението на ТК се дължат на доброто локално кръвоснабдяване, тъй като тези биопродукти стимулират деленето на съдовоендотелните клетки, а от там и ангиогенезата (65).

От описаните клинични експерименти с PRP възникват някои въпроси. Не е ясно дали засилената остеогенеза, описана от някои автори се дължи на конкретни РФ или на формирана фибринова мрежа, която във всеки случай стимулира възстановяването на тъканта (26). Повечето клинични проучвания, демонстриращи ефекта на PRP са без хистологично верифицирани резултати след тъканната регенерация (26). Ефектът на всеки РФ в ТК и точните механизми, по които кръвните продукти влияят върху тъканите на клетъчно и молекулно ниво предстои да се доизяснят (26,147,221). Функцията на ТК се дължи до голяма степен на PDGF, който е основен РФ в регенерацията на меките тъкани и костите (13). Още няма достатъчно клинични и *in vitro* доклади в литературата, доказващи биолгичните ефекти на PDGF върху тъканите.

## II.8.ТРОМБИЦИТЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР (PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR – PDGF)

PDGF е един от РФ с най-висока концентрация в тромбоцитите (97,270). Открит е за първи път от Ross и съавт. през 1974г. (239). Авторите го описват като РФ, получен от тромбоцитите, който е способен да засилва диференциацията на клетъчна култура, изолирана от гладкомускулна тъкан. Освен от тромбоцити, PDGF се продуцира и от други клетъчни типове като макрофаги, ендотелиални клетки, гладкомускулни клетки и т.н. (156).

PDGF съществува под формата на димерна молекула: хомо- или хетеродимер (17,112,123,125,129). PDGF се състои от някои от следните полипептидни вериги: A, B, C или D, свързани помежду си с дисулфиден мост (125,129). Възможните изомерни форми на РФ според съставящите го полипептидни вериги са PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, -DD (14,112,123).

Описани са два типа повърхностни клетъчни рецептори за PDGF – алфа- и бета-рецептори (112,125,129). Към алфа-рецепторите с висок афинитет се свързват всички изомерни форми, докато с бета-рецепторите се свързват само PDGF-BB и в по-малка степен PDGF-AB (125). PDGF се свързва в точно определен епитоп на рецептора, разположен между втория и третия имуноглобулинов домен (129). Следва процес на активиране на рецепторите и автофосфорилиране на няколко места в цитозолните домени (223). Медиира се свързването на ко-фактори и активиране на сигнална трансдукция (74). Тя може да бъде реализирана по различни пътеки: най-често PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase-фосфатидилинозитол-3-киназа) или STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3-сигнален трансдуктор и активатор на транскрипцията 3) (45). Тези пътеки се асоциират с процеси като клетъчна диференциация, пролиферация, миграция, както и с неконтролираното клетъчно делене при тумори (164).

PDGF се намира в тромбоцитите и по-точно в техните алфа-гранули, както останалите РФ (167,200). При нарушаване тъканния интегритет, този РФ се освобождава при тромбоцитната дегранулация във формирания кръвен съсирек (232). Има кратък полуживот и циркулира в кръвта в продължение на около 30 мин. (49,180).

PDGF участва в множество биологични процеси. Едни от най-важните са: стимулиране на оздравителните процеси в меките тъкани и костите, участва в развитието на централната нервна система; той е главен митоген за остеобласти, недиференцирани остеопрогениторни клетки, фибробласти, гладкомускулни клетки, глиални клетки, стимулира химиотаксиса на неутрофили и макрофаги към мястото на тъканно увреждане, участва в процеси на реепителизация и ангиогенеза (14,32,116,129,316). PDGF реализира активността си в ранните етапи на оздравителния процес като стимулира функцията най-вече на неутрофили и макрофаги (253). Тези клетки представляват главните медиатори в началния етап на тъканна регенерация (253). Според автори, при някои типове клетки PDGF стимулира оздравителните процеси посредством иницииране на колагенов синтез (273). Синтезът на колаген допринася за високата резистентност и механична устойчивост на тъканите в областта на мекотъканно увреждане или в костния калус след травма (47,232).

PDGF е активна молекула, имаща отношение към туморогенезата (61,306). Той стимулира туморната ангиогенеза и регулира секретирането на протеолитични ензими от туморните клетки (61,306). Така потенцира неопластичния растеж и развитието на туморни метастази (89,113). Инхибирането на активността на PDGF чрез различни агенти е един от подходите при лечение на туморни заболявания (113).

### II.8.1.РЕКОМБИНАНТНА ФОРМА НА ТРОМБОЦИТНИЯ РАСТЕЖЕН ФАКТОР – rhPDGF

Докладвано е, че РФ от семейството на PDGF са сред молекулите с най-висока концентрация в ТК в сравнение с останалите РФ (55,221,269). До момента не са открити данни в литературата, касаещи прилагане на изолирани от човешка кръв РФ в *in vitro* и *in vivo* експерименти. В научно-експерименталната и лечебната дейност се прилагат рекомбинантни форми на протеините (213,245). Рекомбинантните активни молекули са концентрирани и пречистени във висока степен (215,314). Провеждат се предклинични и клинични проучвания, доказващи ефектите им върху оздравителните процеси (60,78,212).

Рекомбинантен PDGF (rhPDGF) е първият рекомбинантен РФ, разрешен за употреба от Американската асоциация по храни и лекарства-FDA (Food and Drug Assosiation) под името Regranex, Ethicon, Inc. Somerville, NJ (185,302). Доказано е, че той стимулира възстановяването на хронични улцери при пациенти с диабет (185,302). Широката употреба на препарата се дължи на неговата ефективност и липса на усложнения след приложението му при пациенти (302).

Недостатък на прилагането на PDGF в клиниката се отнася до краткия му полуживот (49,180). Повишаване локалната концентранция на екзогенен РФ в тъканите крие риск от нежелани странични ефекти като индуциране на туморен растеж (198). Проблемът с краткия полуживот води до разработването на материали, формиращи депо за по-бавно локално освобождаване на РФ (240).

### II.8.2.ЕФЕКТ НА ТРОМБОЦИТНИЯ РАСТЕЖЕН ФАКТОР ВЪРХУ КЛЕТЪЧНАТА ПРОЛИФЕРАЦИЯ, СИНТЕЗА НА КОЛАГЕН И МИНЕРАЛИЗАЦИЯТА *in vitro*

Ефекти на PDGF върху клетъчните процеси *in vitro* са докладвани от много автори. Експериментите са насочени най-вече към установяване митогенната активност на РФ. Установено е, че PDGF стимулира фибробластната пролиферация, като стимулира клетката да премине в

G2/M-фаза на клетъчния цикъл (14). РФ повлиява генната експресия, миграцията и синтеза на ЕЦМ както на фибробласти, така и на моноцити, макрофаги и други инфламаторни клетки (232).

Boyan и съавт. (50) изследват влиянието на три изомерни форми на PDGF (PDGF-AA, -BB и -AB) върху митотичното делене и химиотаксиса на хетерогенна клетъчна култура от ПДЛ. Според авторите най-високо активен от изомерите е PDGF-BB. Този изомер е силен митоген и химиоатрактант с изразена концентрационнозависима активност (50).

Резултатите от експерименти, касаещи ефекта на PDGF върху остеогенната диференциация на някои клетъчни типове остават спорни. Според Kratchmarova и съавт. (153) PDGF не стимулира диференциацията на човешки МСК до остеобластоподобни. Strayhorn и съавт. (267) доказват способността на PDGF да потенцира остеобластната пролиферация в *in vitro* условия. В изследването са включени само две концентрации на РФ: 10 ng/ml и 20 ng/ml. Според авторите РФ не засилва остеогенната клетъчна диференциация. Същите установяват, че PDGF блокира генната експресия на два от маркерите за остеогенна клетъчна диференциация: остеопонтин и остеокалцин.

Докладвано е, че PDGF-AB стимулира клетъчната пролиферация и химиотаксиса на клетки от ПДЛ, изолирани от миши тъкани (193). РФ потенцира и колагеновия синтез при същите клетки. Авторите описват концентрационна зависимост в активността на РФ върху клетъчните процеси. Изследвания от други автори също са в подкрепа на способността на PDGF да стимулира колагеновата продукция (114). Има описани резултати, според които PDGF-изомерите имат много по-слаб индуциращ ефект върху колагеногенезата в сравнение с други РФ (312).

В експеримент на Ojima и съавт. (220) се изследва активност на ниски концентрации PDGF-BB върху клетки от ПДЛ. За установяване на пролиферативния потенциал на РФ, авторите прилагат концентрации от

0.01 до 10 ng/ml, а за стимулиране на колагеновата продукция – от 0.1 до 10 ng/ml. Авторите описват дозозависим ефект на PDGF. Оптимална активност върху пролиферацията на клетките имат по-високите концентрации (10 ng/ml), докато колагеновата продукция е по-значителна при 1 ng/ml от РФ.

Изследван е ефектът на PDGF-BB върху активността на ензима алкална фосфатаза (alkaline phosphatase-ALP) (ранен маркер за остеогенна диференциация), както и върху протеиновия синтез (314). Авторите култивират клетки от ПДЛ върху дентинови блокчета от екстрахирани зъби. Резултатите показват, че PDGF-BB увеличава продукцията на протеини от клетките и инхибира ALP-активност (314).

Papadopoulos и кол. (225) изследват ефекта на PDGF-BB в комбинация с алогенна кост върху клетки от ПДЛ. Авторите култивират клетките при селектираните условия за период от 48ч. Резултатите показват, че РФ заедно с алогенната кост увеличават съдържанието на ДНК в клетките, т.е. стимулират пролиферацията. Според авторите обогатяването на хранителната среда само с PDGF-BB (без алогенна кост) не води до засилен митогенен ефект върху клетките.

Sant'Ana и кол. (243) докладват, че PDGF може да действа синергистично в комбинация с други РФ. Според авторите комбинацията от 2 и повече РФ засилва активността им по отношение на пролиферация и адхезия при клетки от ПДЛ.

### II.8.3.ЗНАЧЕНИЕ НА ТРОМБОЦИТНИЯ РАСТЕЖЕН ФАКТОР ЗА ОРАЛНАТА ХИРУРГИЯ

Ефектът на PDGF върху регенерацията на пери-имплантити и пародонтални дефекти е основен акцент в изследванията с рекомбинантната форма на този РФ в оралната хирургия (194). Интерес представлява приложението му при хоризонтална костна аугментация

(213), запазване височината на алвеоларния израстък след зъбна екстракция (презервация на алвеолата) (255) и т.н. PDGF обикновено се поставя локално в комбинация с авто-, ало-, ксенотрансплантат или синтетичен материал (бета-трикалциев фосфат) (266). РФ стимулира ангиогенезата, миграцията и пролиферацията на клетки от околната тъкан (116). Материалът, който играе роля на депо за PDGF осигурява задържане на по-висока локална концентрация на РФ и изпълнява механична функция (99). Така формирането на нова тъкан (кост, цимент, ПДЛ) ще се реализира по-бързо и пълноценно (316).

Изследван е ефектът на PDGF върху едно-, дву- и тристенни костни дефекти при зъби с пародонтит (214). Авторите прилагат различни концентрации на РФ в комбинация с бета-трикалциев фосфат. Според резултатите само по-ниските концентрации имат добър регенеративен ефект върху тъканите след период от 3 и 6 месеца. Като контрола служат зони, третирани само с бета-трикалциев фосфат без PDGF.

PDGF може да се аплицира директно около зъбни имплантати. McAllister и съавт. (194) изследват влиянието на PDGF-BB върху процеса на костна регенерация и остеоинтеграция около имплантати, поставени имедиатно след екстракция на зъбите. РФ е аплициран в комбинация с бета-трикалциев фосфат или депротеинизирана телешка кост. Резултатите сочат, че в зоните, в които присъства PDGF-BB, е настъпила 100% остеоинтеграция на имплантатите.

Nevins и съавт. (215) прилагат PDGF при опит за лечение на зъби, подлежащи на екстракция, поради напреднала костна резорбция и III степен подвижност. РФ е използван в комбинация с алогенна присадка – минерализирана лиофилизирана кост. Дефектите са покрити и с мембрана. След 6 месеца третираните зони показват излекуване на възпалителния процес в меките тъкани и формиране на нова кост.

PDGF е използван и за лечение на клас II фуркационни лезии при зъби с тежък пародонтит (60). Авторите аплицират различни концентрации от РФ в комбинация с алогенна костна присадка. Резултатите показват стимулиране на тъканната регенерация и липса на възпалителни усложнения в зоните, третирани с по-високи концентрации.

Резултатите от клинични експерименти с прилагане на rhPDGF и тези, в които се аплицират локално МСКПДЛ са спорни. Не е ясно, кои процеси в стволовите клетки са повлияни в най-голяма степен от този РФ. С провеждането на *in vitro* експерименти, изясняващи ефектите на PDGF-BB ще се докаже дали активната молекула стимулира предимно клетъчната пролиферация, дали засилва колагеновата синтеза или минерализацията, дали по-скоро поддържа клетките недиференцирани. Резултатите от такива експерименти ще дадат отговор дали РФ стимулира предимно мекотъканната или костната регенерация в периодонциума. По този начин би се осигурила по-добра предвидимост за изхода от лечението с rhPDGF в оралната хирургия и ще се дадат възможности за развитие на стволовоклетъчната терапия. Именно липсата на достатъчно информация относно регенеративния потенциал на МСКПДЛ и rhPDGF ни насочват към провеждане на експериментите по настоящия научен труд.

## II.9.АНАЛИЗ НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

След направения преглед на литературата се установява, че в ПДЛ на постоянни зъби има наличие на специфични клетъчни популации, притежаващи типични характеристики на ССК. Те могат да формират колонии, да експресират специфични маркери и да се диференцират до различни клетъчни типове, както всички МСК. Освен това, МСКПДЛ са способни да инициират формиране на пълноценен ПДЛ след *in vivo* имплантиране в опитни животни (248,249). Високите регенеративни способности на периодонталните стволови клетки водят до идеята за тяхното бъдещо клинично приложение в лицево-челюстната и оралната хирургия с цел стимулиране на оздравителния процес при редица патологични състояния. Въпреки големия потенциал на този клетъчен тип, много въпроси относно тяхното поведение остават неясни.

Широко дискутирани и частично решени са въпросите, свързани с характеризирането на МСКПДЛ. Установен е техния потенциал за мултилинеарна диференциация, но доказването на стволовоклетъчния им фенотип все още се прави на базата на сравнително малък брой маркери. Не е доказан универсален маркер, който да се експресира в еднаква степен при МСКПДЛ, получени от различни донори. Включването на по-голям брой стволовоклетъчни маркери в експериментите ще даде една по-голяма достоверност на резултатите, че изолираните клетки действително са стволови.

Има твърдения, според които продължителното клетъчно култивиране води до спонтанна автодиференциация на стволовите клетки (137). В този смисъл частично решени остават и проблемите, свързани с търсенето на оптимални условия на клетъчно култивиране, при които да бъде съхранен стволовоклетъчния фенотип на МСКПДЛ за дълъг период от време. В литературата, като цяло до момента няма достатъчно проучвания, които показват промяна във функциите на МСКПДЛ след

култвирането им *in vitro* в среда с добавени различни биологично активни молекули. Липсват достатъчно изследвания, които да покажат как експозицията с различни РФ влияе върху динамиката на популацията и на стволовоклетъчните свойства.

Проведените до момента *in vitro* и предклинични експерименти върху животни с МСКПДЛ са крайно недостатъчни за реализиране на тяхното клинично приложение (103,148,317,318). Опитните постановки с приложение на МСКПДЛ върху хора са само ретроспективни и са много малко на брой (103,111). До момента не са намерени такива изследвания с високо ниво на достоверност (Ниво на достоверност А и Б).

Редица съвременни лечебни подходи в хирургията са насочени към прилагането на различни имплантати, тъканни присадки и заместители, рекомбинантни форми на РФ, автоложни ТК (13,71,75,155,185,271,278). Една популярна напоследък група биоматериали за локално приложение в хирургията са ТК. Много автори демонстрират способността на тези автоложни кръвни продукти да стимулират оздравителните процеси в лицево-челюстната област (51,76,77,88,281). Ефектът им се дължи на големия брой тромбоцити и плеядата активни молекули, която се отделя след тяхното активиране. Резултатите от клиничното приложение на ТК са крайно противоречиви (2,13,15,63,88,211,271). Много въпроси относно ефектите на ТК остават нерешени:

- не е известно дали активността им се дължи на гъстата фибринова мрежа, която образуват на мястото на аплицирането им или се дължи по-скоро на функцията на РФ;
- не е ясна индивидуалната роля на всеки РФ за биологичните процеси и не е възможно да се прецени значението на локалната концентрация на всеки РФ върху неговата активност. Индивидуалното изследване на влиянието, което всеки един РФ *in*

*vitro* оказва върху клетъчните процеси може да се установи по-лесно с прилагането на техните рекомбинантни форми.

Един от най-изследваните РФ е PDGF. Той е първият РФ, чиято рекомбинантна форма се предлага за клинична употреба при лечение на незарастващи кожни улцери (185,302). Вече има изследвания, които изучават ефектите на PDGF в клиниката. Рекомбинантен PDGF-BB се прилага за лечение на пародонтални дефекти, пери-имплантити, аугментация на алвеоларна кост (60,212,213,214,215). Резултатите, докладвани от различните автори все още са разнообразни и спорни. Няма общоприети утвърдени терапевтични протоколи и най-вече не е ясно върху кои биологични процеси в ПДЛ влияе този РФ.

Установено е, че PDGF стимулира клетъчната пролиферация, ангиогенезата, процесите на синтез и т.н. От друга страна е известно и значението му за туморогенезата (61,198). Описаните до момента *in vitro* експерименти с PDGF и клетки от ПДЛ са насочени предимно към установяване значението на РФ за пролиферацията и клетъчната миграция. Повечето от тези експерименти са проведени още преди да бъде доказано, че в ПДЛ има наличие на МСК.

Нерешен остава въпросът, свързан с влиянието на PDGF-BB върху стволовоклетъчните свойства на МСКПДЛ:

- на този етап не е известно дали РФ стимулира диференциацията им или поддържа стволовоклетъчния фенотип.
- липсват данни в литературата, които доказват ефекта на PDGF-BB върху синтеза и матурацията на колаген, респ. ЕЦМ и не е известно как влияе върху минерализационните процеси в периодонтални стволови клетки.
- не е изяснено дали ефектите на PDGF-BB са концентрационнозависими. Въвеждането на PDGF в рутинната хирургична практика като активно вещество, стимулиращо

регенеративните процеси изисква добра колаборация и стабилна връзка между *in vitro* и *in vivo* експерименти.

Изследванията върху зъбни МСК с цел развитие на стволовоклетъчната терапия, както и конкретизиране ефектите на РФ върху регенеративните процеси са актуални и широко дискутирани въпроси в световната литература. Тези проучвания все още са в начален етап и данните, получени от тях са оскъдни и несистематизирани. Липсата на достатъчно информация относно регенеративния потенциал на периодонталните МСК и липсата на информация относно ефекта на PDGF-BB върху тях, като основен РФ в ТК, са мотив за провеждането на изследванията по настоящия научен труд.

# СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

## III.ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Целта** на настоящия труд е да бъде изследван ефектът на рекомбинантен PDGF-BB върху МСК, изолирани от ПДЛ в *in vitro* условия и да се изясни значението на РФ и на стволовите клетки за тъканнорегенеративните процеси.

За реализиране на поставената цел е необходимо изпълнението на следните експериментални **задачи**:

**1** Да се изолират МСК от ПДЛ на човешки постоянни зъби. Да бъдат получени достатъчно клетки, имащи типична морфология и функция на стволови клетки; клетките да бъдат успешно култивирани в *in vitro* условия.

**2** Да се докаже стволовоклетъчният характер на културите чрез изследване експресията на специфични клетъчни маркери. Въз основа на експресията на маркери да се потвърди, че изолираните клетки от ПДЛ на постоянни зъби в действителност са стволови.

**3** Да се изследва ефектът на PDGF-BB върху клетъчната пролиферация и клетъчния цикъл, респ. влиянието на PDGF-BB върху поддържане на стволовоклетъчната култура, върху клетъчната репопулация в зони с клетъчен дефицит и върху риска от неконтролируема клетъчна пролиферация.

**4** Да се изследва влиянието на PDGF-BB върху способността на клетъчната култура да експресира специфични стволовоклетъчни маркери. Да се установи дали PDGF-BB стимулира клетъчната диференциация или запазва стволовоклетъчния фенотип на периодонтални МСК.

**5** Да се установи ефектът на PDGF-BB върху продукцията на колаген от клетки, изолирани от ПДЛ, с което да се докаже дали РФ допринася за оформянето на пълноценен ЕЦМ и да се оцени рискът от фиброза в тъканите след приложението му върху стволовите клетки.

**6** Да се изследва влиянието на PDGF-BB върху остеогенната диференциация на клетките и да се установи значението му за процесите на минерализация, осификация и атопично отлагане на костна тъкан в периодонциума.

# IV.МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## IV.1.МАТЕРИАЛИ

Периодонталните МСК, необходими за провеждането на експерименталната работа са изолирани от 44 на брой интактни трети молари. Биологичният материал е получен от зъби на здрави пациенти, дали предварително писмено информирано съгласие.

Всички протоколи за научната работа са одобрени от етичната комисия на Медицински университет-София. Финансирането е осигурено от Медицински университет-София (Грант № 42/2015г, Съвет по медицинска наука, МУ-София) и Фонд „Научни изследвания“ (Проект № ДФНИ Б02/15 от 12.12.2014г). Пациентите (44 на брой) – донори на биологичния материал са на възраст между 18 и 40 години. Те постъпват в Катедра по Орална и лицево-челюстна хирургия към Факултета по дентална медицина на Медицински университет-София по повод рутинна екстракция на трети молари. МСК се изолират от ПДЛ по кореновата повърхност на екстрахирани нормално пробили, ретенирани и полуретенирани трети молари.

Критерии за подбор на пациентите и зъбите:

- Възрастови: пациентите да бъдат на възраст между 18 и 40 години
- Пациентите да бъдат клинично здрави
- Интактни трети молари, които подлежат на рутинна екстракция или екстрахирани по ортодонтски показания
- Зъби със запазена цялост, които НЕ се налага да бъдат сепарирани по време на екстракцията
- Зъби, които нямат кариозни лезии

- Отсъствие на възпалителен или неопластичен процес, свързан със зъбите, които подлежат на екстракция

За доказване ефектите на PDGF-BB върху периодонталните МСК е използвана рекомбинантна форма на РФ: rhPDGF-BB (Santa Cruz, Santa Cruz, USA). Рекомбинантният РФ се добавя към хранителна среда за клетъчно култивиране. Клетките се отглеждат в среди с различни концентрации на rhPDGF-BB, за да се установи дали РФ влияе върху клетъчните процеси и дали ефектите му са концентрационно зависими.

В изследването са използвани следните материали за *in vitro* клетъчно култивиране: хранителна среда на Ийгъл, модифицирана от Дълбеко – Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12) high glucose (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany); ФТС (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); инсулин-трасферин-селен (insulin-trasferin-selenium - ITS) (Gibco Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA); антибиотици в комбинация с антимикотик – пеницилин/стрептомицин/амфотерицин (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); ензими за лизиране на тъканните експлантати и получаване на суспензия от единични клетки колагеназа тип I (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) и диспаза (LifeScan, Inc., Milpitas, CA, USA); фосфатен буферен разтвор – Phosphate-buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium); 0,05% трипсин/ЕДТА (етилен-диамин-тетра-ацетат) (Lonza, Verviers, Belgium) за отделяне на адхезирали клетки от дъното на културелни съдове; 2% BSA (bovine serum albumine)-телешки серумен албумин (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); Bradford Reagent (Sigma-Aldrich) за определане количеството общ белтък в пробите; багрило за оцветяване на калциеви нодули Alizarin Red S (AppliChem).

В проучването се установява експресия на стволовоклетъчни и диференциационни маркери в периодонтални МСК. За верифициране на маркерната експресия са използвани следните антитела:

- Стволовоклетъчни: Анти-CD44 (Santa Cruz, Santa Cruz, USA); Анти-CD105/ендоглин (Santa Cruz); Анти-CD117 (Santa Cruz); Анти-STRO-1 (Santa Cruz); Анти-CD49f (интегрин алфа-6) моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA); Анти-CD146 моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, САЩ); Анти-CD271 моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); Анти-CD4 (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland)

- Диференциационни: Анти-ALP IgG (Santa Cruz); Анти-COL1a2 IgG (Santa Cruz); Анти-COL3a1 IgG (Santa Cruz); Анти-SPARC IgG (Santa Cruz); Анти-BSP II (Santa Cruz)

- Вторични флуоресцентни антитела: Козе анти-мише антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 488 IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Магарешко анти-заешко антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 568 IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

В настоящото проучване се провеждат функционални тестове, чрез които се установяват ефектите на PDGF-BB върху клетъчната активност в култури от МСКПДЛ. Оценка на пролиферация, продуциран общ колаген и активността на ензими, отговорни за синтез на ЕЦМ и минерализация

при изследваните периодонтални МСК се извършва посредством следните китове:

- Cytell™ Cell Cycle Kit (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)
- Sircol Collagen Assay Kit (Biocolor Ltd, Carrickfergus, United Kingdom)
- Lysyl Oxidase Activity Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK)
- Alkaline Phosphatase Assay Kit (Fluorometric) (Abnova, Taipei, Taiwan)

## IV.2.МЕТОДИКИ

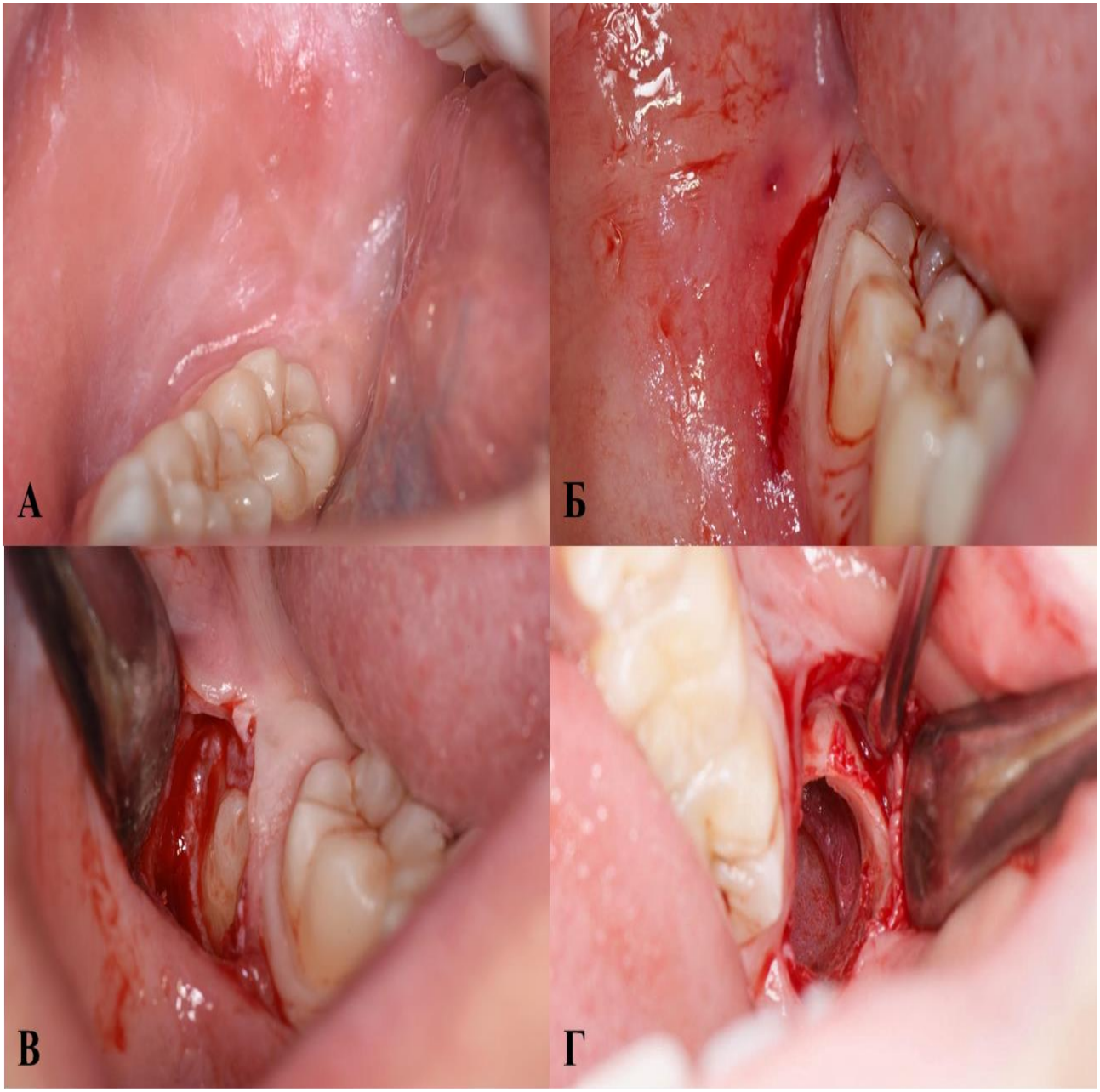
### IV.2.1.Екстракция на трети молари, изолиране, *in vitro* култивиране и характеризиране на клетките.

#### IV.2.1.1.Екстракция на трети молари и изолиране на първична клетъчна култура от периодонтален лигамент.

Екстракция на зъбите:

Екстракцията на всички зъби се провежда под локална анестезия (проводна на долна челюст; терминална/туберална в комбинация с анестезия на n. palatinus major за горна челюст) с 1 до 3 карпули анестетичен разтвор. Нормално еруптиралите трети молари във вертикална позиция се екстрахират чрез обикновена класическа екстракция без оформяне на муко-периостално ламбо.

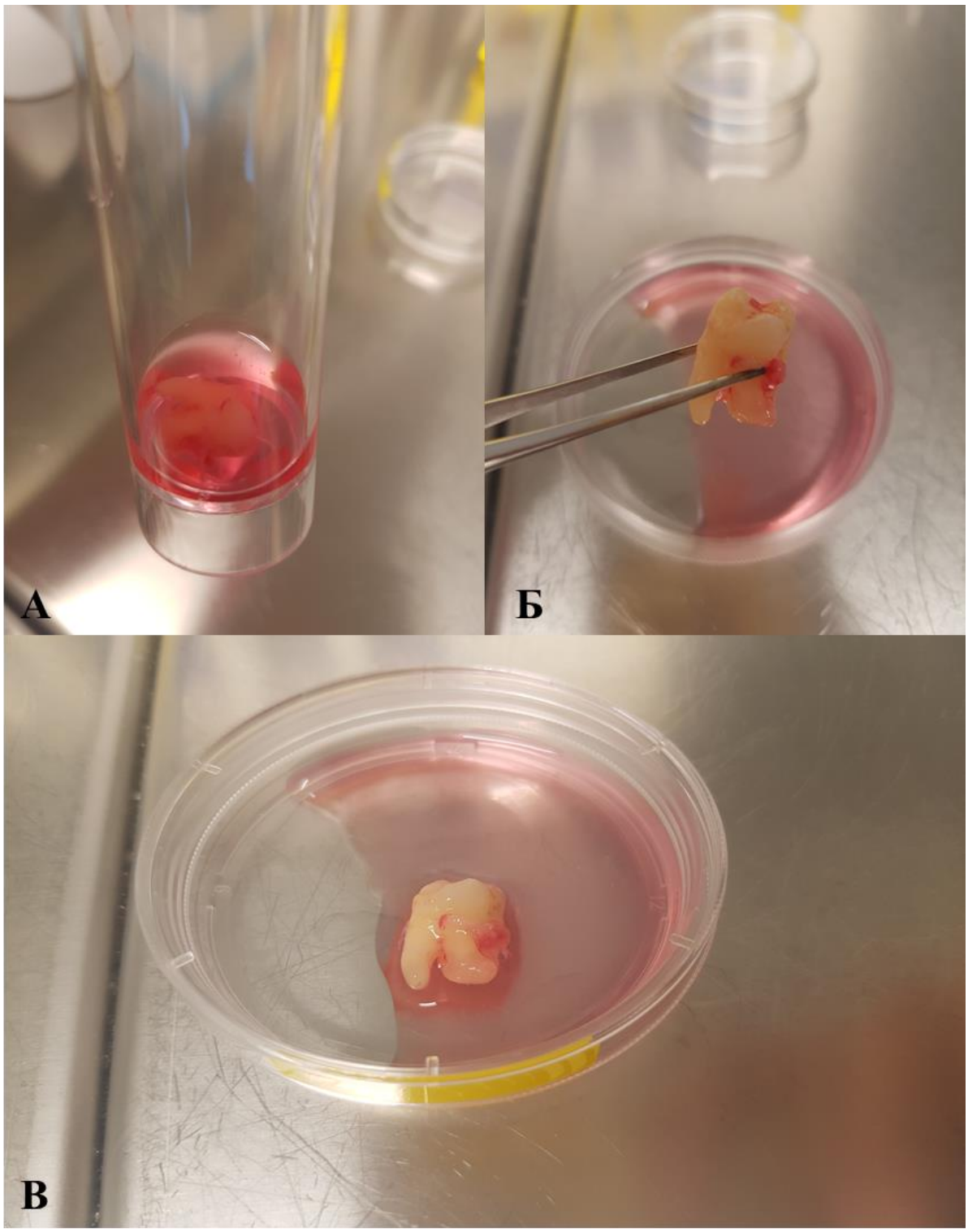
За ретенираните и полуретенираните зъби се провежда хирургична екстракция-extractio per trepanationem/odontectomia – с оформяне на муко-периостално ламбо с вестибуларен достъп (*Фиг. 1 А,Б,В,Г*). Костта, покриваща частично или напълно зъба се премахва с костна фреза. Зъбът се екстрахира със запазена цялост. Острите костни ръбове се заглаждат. Прави се щателна хемостаза и се поставят 2 до 3 шева. На всички пациенти се дават подробни инструкции за следоперативния период.




*Фиг. 1 Етапи на екстракция на долен трети молар*

Зъбите се промиват обилно със стерилен физиологичен разтвор непосредствено след екстракцията. Екстрахираните зъби се съхраняват в стерилни пластмасови контейнери (DELTALAB SL, Pl. La Verneda, Spain) с 3-4 ml хранителна среда с високо съдържание на глюкоза: Хранителна среда на Ийгъл, модифицирана от Дълбеко – Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12) high glucose (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)

с добавени 100 U/ml пеницилин, 100 μg/ml стрептомицин, 0,25 μg/ml амфотерицин (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). В рамките на 24ч., зъбите се транспортират до лабораторията. Там се промиват трикратно с фосфатен буферен разтвор – Phosphate-buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium) (*Фиг. 2*). ПДЛ се събира от средната трета на кореновата повърхност на зъбите чрез внимателно остъргване. За целта се използват стерилни лезвиета №10 и 15 (Heinz Herenz, Hamburg, Germany). Събраният материал се поставя в 0,5-1ml разтвор на 3mg/ml колагеназа тип I (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) и 4mg/ml диспаза (LifeScan, Inc., Milpitas, CA, USA) за 1ч. на температура 37$^{o}$C, 5% $CO_2$ и 50% влажност в инкубатор. Суспензията се центрофугира за 4 мин. при 3000 оборота/мин. Получената на повърхността течна фракция, наречена супернатанта, се отстранява. Утаените клетки се ресуспендират в 1ml хранителна среда и се пропускат през стерилно сито с размер на порите 70μm (BD Falcon, Heidelberg, Germany). Целта е получаването на суспензия от отделни клетки, които самостоятелно да адхезират към дъното на съда, в който се засяват. Клетките се засяват в пластмасови петриеви панички с диаметър 2cm (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) със среда и добавени към нея антибиотик и 20% ФТС (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).




*Фиг. 2 Подготовка на интактен трети молар за изолиране на МСКПДЛ. А-съхранение на зъба в транспортна хранителна среда; Б-прехвърляне на зъба в пластмасова петриева паничка със стерилна пинсета; В-в петрито, зъбът се промива трикратно с PBS.*

### IV.2.1.2.*In vitro* клетъчно култивиране.

Клетките се култивират при температура 37$^{o}$C, 5% $CO_2$ и 50% влажност в инкубатор. През дните след засяване на клетките се следи тяхната миграция от тъканния експлантат и пролиферацията им. При достигане на около 80% конфлуентност/плътност, клетките се отлепят от петритата и се засяват в съдове за клетъчно култивиране, наричани още матраци (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). Прецизно отлепяне на всички клетки се постига след предварителното им промиване с PBS. Следва инкубиране за 10-15мин. с 0,5-1ml 0,05% трипсин/ЕДТА (етилен-диамин-тетра-ацетат) (Lonza, Verviers, Belgium), който да покрие дъното на съда. След това се извършва обилно промиване 2-3 пъти с PBS, за да могат да бъдат събрани всички отлепени клетки. Получената клетъчна суспензия се прехвърля в 15-ml пластмасови епруветки (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) и се центрофугира за 4 мин. на 3000 оборота/мин. Утаените клетки се ресуспендират в хранителната среда и се засяват в нов съд с добавени антибиотици и 10% ФТС. Клетки се засяват с гъстота 5 х $10^3$ до 1 х $10^4$ клетки/$cm^2$.

Всяко трипсинизиране на клетки, достигнали около 85% конфлуентност и трансфера им в нови културелни съдове се нарича пасажиране. Обикновено новият матрак, в който се засяват клетките има 3-4 пъти по-голяма площ от предходния. При всяко пасажиране, номерът на клетъчния пасаж се увеличава с единица. По този начин става възможно получаването на много голямо количество клетъчен материал за провеждане на експериментите. Резултатите в настоящия научен труд са получени не на база на брой пациенти, от които е взет биологичния материал, а на базата на многократни повторения на всеки един от експериментите. За всеки експеримент се провеждат от 3 до 7 независими

повторения. Така се предоставят голям брой данни, които се подлагат на статистическа обработка за доказване на достоверността на резултатите.

Изследванията в настоящия научен труд се провеждат с клетки до четвърти пасаж поради опасения от понижаване на жизнеността и активността на клетките с увеличаване поредния номер на пасажа.

### IV.2.1.3.Характеризиране: изследване експресията на маркери при клетките, изолирани от периодонтален лигамент.

Способността на изолираните клетки да експресират маркери, характерни за МСК се установява с прилагането на количествени и качествени методи. Така се доказва, че в тъканите, които изследваме има наличие на стволови клетки. Очакваме клетките да притежават изразен пролиферативен и диференциационен потенциал, да могат да се размножават в хранителни среди и да се самообновяват.

За доказване способността на клетките да експресират стволовоклетъчни маркери, се използват по-ранни пасажи. Според научни доклади с увеличаване на поредния номер на пасажа, експресията на стволовоклетъчни маркери намалява (137).

#### IV.2.1.3.1.Флоуцитометричен анализ

Флоуцитометрията е метод, който позволява изследване и анализ на редица клетъчни характеристики. За целта клетките трябва да бъдат в суспензия и да бъдат белязани с флуоресцентни антитела. Антителата обикновено се свързват към специфични протеини по повърхността на клетката или вътре в нея. Клетъчната суспензия се пропуска през

фокусиран лазерен лъч. Методът дава информация, свързана с клетъчния размер, състоянието на ДНК и РНК, състав на цитоплазмата, екпресия на повърхностни и вътрешноклетъчни маркери и протеини. Отчитането на резултатите се прави на базата на интензитета от разсеяната и излъчената от частиците (в случая клетките) светлина.

В настоящото проучване, клетки между 1-ви и 3-ти пасаж се засяват при гъстота 5000 клетки/$cm^2$ в културелни съдове/матраци с площ 175$cm^2$ (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). Първоначалното засяване е при стандартни условия: DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС. След 24ч средата се сменя с DMEM и 1% ITS (Gibco Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA), като заместител на ФТС. Хранителната среда се сменя всеки 2-ри или 3-ти ден. Клетките достигат необходимата плътност от 80-85% в рамките на 7-10 дни. След това се провежда флоуцитометричен анализ за установяване експресията на повърхностни маркери. Като негативна контрола служат клетки, небелязани с антитела, т. нар. неоцветена контрола.

**В експеримента се използват:**

- PBS
- 0,05% трипсин/ЕДТА
- 15 ml пластмасови епруветки
- 2% BSA (bovine serum albumine)-телешки серумен албумин (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)
- Моноклонални антитела произведени в мишка или в заек:
  Анти-CD44 (Santa Cruz, Santa Cruz, USA)
  Анти-CD105/ендоглин (Santa Cruz)
  Анти-CD117 (Santa Cruz)
  Анти-STRO-1 (Santa Cruz)

Анти-CD49f (интегрин алфа-6) моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)

Анти-CD271 моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Miltenyi Biotec)

Всички изброени маркери се асоциират със стволовоклетъчен фенотип. Очаква се, че клетките, които ги експресират притежават всички качества, характерни за стволовите клетки.

Антителата CD44, CD105, CD117, STRO-1, използвани в експериментите не са директно свързани с флуорохром. Това налага използването на вторични флуоресцентни антитела, които се свърват с първичните и така да се установи експресията. В настоящото изследване се използват следните вторични флуоресцентни антитела:

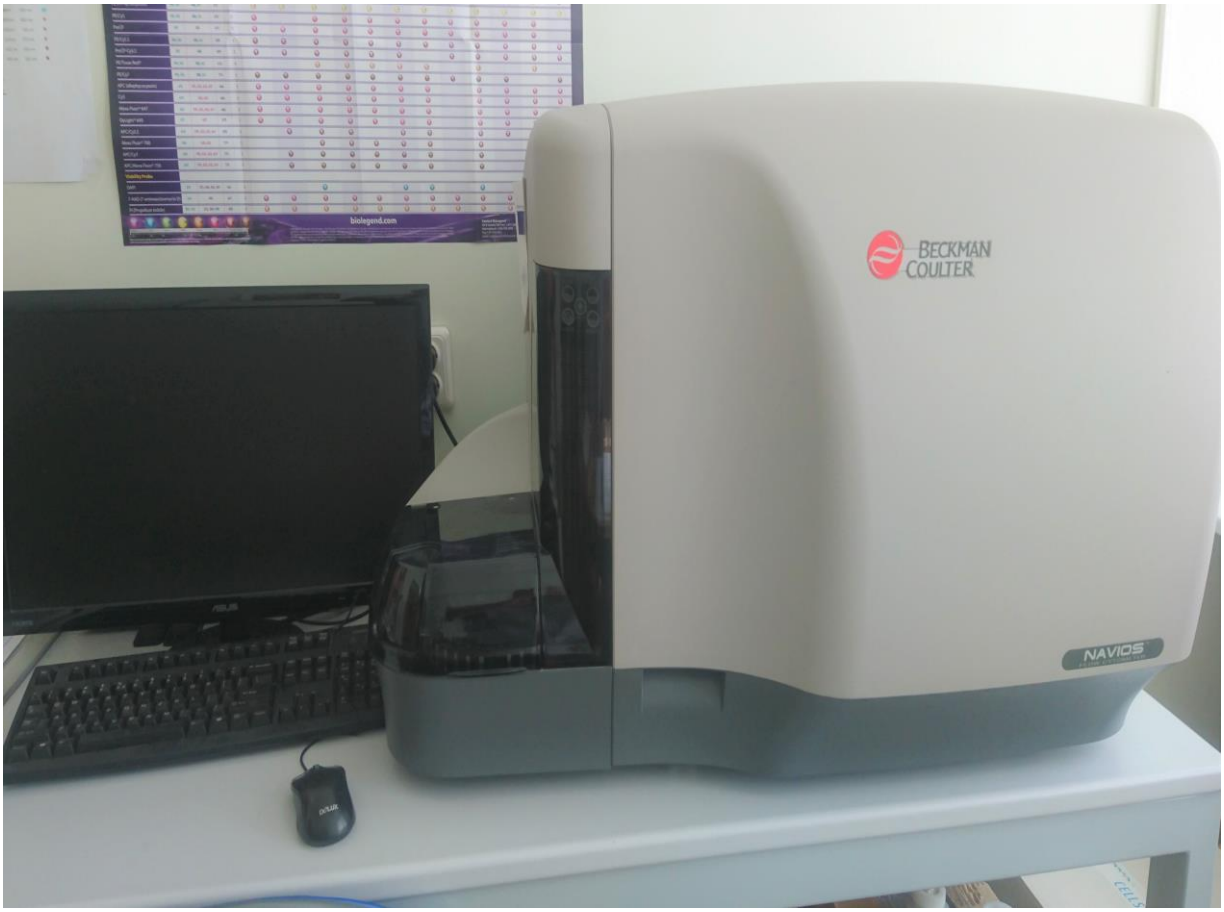
- Козе анти-мише антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 488 IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Магарешко анти-заешко антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 568 IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

**Прилага се следният протокол:**

- Клетките в културелния съд се измиват с PBS за 5мин.
- Инкубиране с 2ml 0,05% трипсин/ЕДТА в рамките на 10мин., за да бъдат отлепени клетките от дъното на съда за клетъчно култивиране
- Разпределяне на клетките по равен брой в 15-ml пластмасови епруветки
- Инкубиране с 2% BSA в PBS, за да бъдат блокирани неспецифичните места за свързване на антителата
- Измиване на клетките с PBS за 5мин.

- Инкубиране на клетките за 30мин. на стайна температура ($19^{o}$-$25^{o}$C) с първично антитяло небелязано с флуорохром, разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:250
- Антитела CD49f и CD271, директно конюгирани с флуорохром, се добавят разредени в 2% BSA-PBS в съотношение 1:1000; инкубират се също за 30 мин. на стайна температура, далече от пряка светлина
- Измиване на клетките, белязани с моноклонални антитела (неконюгирани с флуорохром) с PBS за 5мин.
- Маркиране на първичните моноклонални антитела, неконюгирани с флуорохром чрез инкубиране с вторични, конюгирани с флуоресцентен маркер за 20 мин. на тъмно
- След всяко измиване, клетките се центрофугират за 4 мин. на 3000 оборота/мин.

Клетки се изследват с Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland) (*Фиг. 3*) и анализират с Kaluza Analysis Software Cytometer (Beckman Coulter International SA).




*Фиг. 3 Апарат за флоуцитометричен анализ Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland)*

### IV.2.1.3.2.Имунофлуоресценция

Имунофлуоресценцията е качествен метод за изследване на експресираните клетъчни маркери при *in vitro* селектирана клетъчна култура. Методът се основава на свързването на антитела, белязани с флуоресцентна боя (флуорохром, флуорофор) към специфични клетъчни антигени. Имунофлуоресценцията бива директна и индиректна. При първата се прилага само едно първично антитяло, директно конюгирано с флуорохром. При втория тип имунофлуоресценция, първичното антитяло е неконюгирано с флуорохром. Това налага прилагането на вторично антитяло, белязано с флуоресцентна боя, което се свързва с първичното.

В настоящото проучване експресията на повърхностни и на вътрешноклетъчни маркери е доказана в отделни експерименти. Протоколите на работа са подробно описани.

За отчитане на имунофлуоресценция се използва IN Cell Analyzer 6000 imaging system (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) (*Фиг. 4*). Апаратът представлява високо чувствителна лазерна конфокална система за създаване на изображения и анализ. Лазерите му имат способността да улавят и отчитат дори минимални нива на флуоресценция в изследваните проби. Използва се именно този апарат, тъй като с него се засичат и най-слабите сигнали след оцветяване на клетъчните култури с флуоресцентни маркери. Друго важно изследване, което може да се проведе чрез този апарат, отново на базата на флуоресценция е количеството на ДНК в клетката. Възможно е да се направи анализ на клетъчния цикъл и пролиферация.

При изследване експресията на маркери се долавя флуоресценцията едновременно в два (или повече) от каналите на системата. Първият канал (син) идентифицира флуоресцентно оцветените клетъчни ядра; вторият канал (зелен) отчита флуоресценцията на специфичен протеин, свързан с рецептор по клетъчната повърхност или във вътрешността на клетката.




*Фиг. 4 Система за фенотипен клетъчен анализ IN Cell Analyzer 6000 imaging system (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)*

**IV.2.1.3.2.1.Изследване експресията на <u>повърхностни маркери</u>**

Изследва се експресията на CD49f, CD117, CD146, CD271, STRO-1 при клетки, изолирани от ПДЛ; като негативна контрола се използват клетки, оцветени само с нуклеинови бои за визуализиране на клетъчното ядро.

Клетки от 2-ри до 4-ти пасаж се засяват в 96-ямкова плака (TPP®, Трасадинген, Switzerland) с гъстота 5 x $10^3$ клетки/$cm^2$.

**В експеримента се използват:**

- 4% параформалдехид
- BSA
- PBS
- Моноклонални антитела произведени в мишка или в заек:

  Анти-CD49f (интегрин алфа-6) моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)

  Анти-CD146 моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, САЩ)

  Анти-CD271 моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)

  Анти-CD117 моноклонално антитяло (Santa Cruz)

  Анти-STRO-1 моноклонално антитяло (Santa Cruz)

- Като втори антитела се използват:

  Козе анти-мише антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 488 IgG (Invitrogen)

  Магарешко анти-заешко антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 568 IgG (Invitrogen)
- Нуклеинови бои (за визуализиране на клетъчните ядра): 4’,6-диамидино-2-фенил-индол, дихидрохлорид (DAPI) и SYBR®Green (Invitrogen).

**Протокол за непряка имунофлуоресценция** (за антителата, които не са конюгирани с флуорохром):

- фиксиране на клетките с 4% параформалдехид-30 мин.; по 100μл във всяка ямка от 96-ямковата плака

- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко

- блокиране на неспецифичните места за свързване на антителата-1% BSA в PBS-30 мин.
- измиване с PBS - 3 пъти по 5 мин. всяко
- сатуриране на клетките с първото антитяло, разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:250 за 60 мин.
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко
- маркиране на свързаните антитела с второ антитяло, конюгирано с флуоресцентен маркер разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:1000 за 60 мин. на тъмно
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко
- оцветяване на ядрата на клетките с нуклеинова боя-15 мин.
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко

Препаратите се наблюдават с конфокален флуоресцентен микроскоп (Leica, DMRE, Leica Microsystems GmbH, Germany) и с IN Cell Analyzer 6000 imaging system (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA).

**Протокол за пряка имунофлуоресценция** (за антитела, конюгирани с флуорохром):

- фиксиране на клетките с 4% параформалдехид-30 мин.; по 100μл във всяка ямка от 96-ямковата плака
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко
- блокиране на неспецифичните места за свързване на антителата-1% BSA в PBS-30 мин.
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко
- сатуриране на клетките с антитяло, конюгирано с флуоресцентен маркер разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:1000 за 60 мин.на тъмно
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко
- оцветяване на ядрата на клетките с нуклеинова боя-15 мин.

- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко

Препаратите се наблюдават с конфокален, флуоресцентен микроскоп и с IN Cell Analyzer 6000 imaging system (*Фиг. 4*).

### IV.2.1.3.2.2 Изследване експресията на <u>вътрешноклетъчни маркери</u>

Изследват се следните антитела:

- ALP
- Колаген 1A2 (COL1a2)
- Колаген 3A1 (COL3a1)
- SPARC

Експресията на тези маркери при клетки от ПДЛ се сравнява с негативна контрола от клетки на ПДЛ, оцветени само с нуклеинови бои за визуализиране на клетъчното ядро.

Клетки от 2-ри до 4-ти пасаж се засяват в 96-ямкова плака с гъстота $5x10^3$ клетки/$cm^2$.

**В експеримента се използват:**

- 4% параформалдехид
- Tween20 (ICN Biomedicals Inc, Аурора, САЩ)
- Triton X-100 (Calbiochem - Merck, Дармщад, Германия)
- BSA
- PBS
- Моноклонални антитела произведени в мишка:

  Анти-ALP IgG (Santa Cruz)

  Анти-COL1a2 IgG (Santa Cruz)

  Анти-COL3a1 IgG (Santa Cruz)

  Анти-SPARC IgG (Santa Cruz)

- Като второ антитяло се използва козе анти-мише антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 488 IgG (Invitrogen)
- Нуклеинови бои (за визуализиране на клетъчните ядра)-DAPI

Предполага се, че описаните антитела могат от една страна да се свързват с мембранни рецептори, а от друга-да присъстват вътре в самата клетка. Поради тази причина, за оптимално отчитане на тяхната експресия се прилага протокол за непряка флуоресценция с пермеабилизиране на клетъчната мембрана.

**Протокол за непряка имунофлуоресценция:**

- фиксиране на клетките с 4% параформалдехид-30 мин.; по 100μл във всяка ямка от 96-ямковата плака
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко
- пермеабилизиране: 0,05% Tween 20 в PBS-10 мин; 0,05% TritonX 100 в PBS - 30 мин.
- блокиране на неспецифичните места за свързване на антителата-1% BSA в PBS - 30 мин.
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко
- сатуриране на клетките с първото антитяло, разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:250 - 60 мин.
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко
- маркиране на свързаните антитела с второ антитяло, конюгирано с флуоресцентен маркер разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:1000 за 60 мин. на тъмно
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко
- оцветяване на ядрата на клетките с нуклеинова боя - 15 мин.
- измиване с PBS-3 пъти по 5 мин. всяко

Препаратите се наблюдават с конфокален, флуоресцентен микроскоп (Leica, DMRE, Leica Microsystems GmbH, Germany) и с IN Cell Analyzer 6000 imaging system (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)

### IV.2.2.Изследване влиянието на PDGF-BB върху клетъчния цикъл и пролиферация

#### IV.2.2.1.Изследване ефекта на PDGF-BB върху клетъчния цикъл

Клетки 4-ти пасаж, изолирани от ПДЛ се засяват в 96-ямкова плака с гъстота 5 x $10^3$ клетки/$cm^2$ в среда DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС. Инкубират се за 24ч., през които се постига адхезирането им към дъното на ямките. След това средата се сменя с DMEM с добавени само 0,1% ФТС за още 24ч. Клетъчната култура се инкубира в среда с минимално количество серум, за да се постигне забавяне на клетъчната пролиферация. Така клетките преминават в една и съща фаза (**G0**) на клетъчния цикъл. На следващия ден средата отново се сменя с DMEM с добавени 0,1% или 10% ФТС. Към тези условия се добавя и РФ PDGF-BB (Santa Cruz) в концентрация 50ng/ml. Избраната концентрация е заимствана от данни в научната литература (218,243).

Изследва се влиянието на следните четири различни типа среди върху фазите на клетъчния цикъл:

- DMEM + 0,1% ФТС,
- DMEM + 10% ФТС,
- DMEM + 0,1% ФТС + 50ng/ml PDGF-BB,
- DMEM + 10% ФТС + 50ng/ml PDGF-BB.

Клетъчните култури се инкубират за период от 48ч. Клетъчният цикъл се изследва със Cytell™ Cell Cycle Kit (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). Активното вещество в комплекта (Reagent G) се свързва с ДНК в клетъчното ядро.

Използваният протокол е по препоръки на производителя на използвания кит:

- Клетъчните култури се фиксират с леденостуден метанол
- Инкубиране с т.нар. Reagent G за 45 мин. на 37$^{o}$C
- Наблюдаване на препаратите с IN Cell Analyzer 6000 imaging system (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA).
- Отчитане и анализ със софтуер - In Cell Analyzer Workstation 3.7.3 (GE Healthcare)

### IV.2.2.2.Изследване ефекта на PDGF-BB върху клетъчната пролиферация

Стволовите клетки обикновено се отглеждат в среда с добавен ФТС. Той е важен елемент за клетъчната адхезия, растеж и пролиферация. Широко се използва за *in vitro* култивиране на еукариотни клетки (137). Съществен недостатък на хранителни среди с високо съдържание на ФТС е неизвестната концентрация и съотношение на активните молекули в него. Поради тези причини в настоящия научен труд, повечето от експериментите се провеждат върху клетки, култивирани в безсерумна среда.

За изследване на пролиферацията клетки с гъстота 5 x $10^3$ клетки/$cm^2$ от 2-ри до 4-ти пасаж се засяват в 96-ямкова плака в среда DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС. След 24ч. средата се сменя с DMEM с добавени антибиотик и 1% ITS (като заместител на серума). Добавя се и

PDGF-BB в следните концентрации: 1ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml. За контрола се използват клетки, култивирани в среда, съдържаща само 1% ITS без PDGF-BB. Целта е да се изследва самостоятелното влияние на PDGF-BB върху клетъчната пролиферация и да се елиминира всеки минимален ефект на другите активни молекули във ФТС. Клетъчните култури се инкубират в среда със съответните концентрации на изследвания РФ в продължение на 48ч. За установяване на клетъчния брой се използва Cytell™ Cell Cycle Kit (GE Healthcare). Активното вещество в комплекта (Reagent G) се свързва с ДНК в клетъчното ядро.

Използваният протокол е по препоръки на производителя:

- Фиксиране на клетъчните култури с леденостуден метанол
- Инкубиране с т.нар. Reagent G за 45 мин. на 37$^{o}$C
- Наблюдаване на препаратите с IN Cell Analyzer 6000 imaging system
- Отчитане и анализ със софтуер-In Cell Analyzer Workstation 3.7.3

### IV.2.3. Флоуцитометричен анализ на стволови клетки от периодонтален лигамент, култивирани в безсерумна среда с добавен PDGF-BB

Клетки от ПДЛ между 1-ви и 3-ти пасаж се засяват в културелни съдове с площ 175cm$^2$ с гъстота 5000 клетки/cm$^2$. Те се култивират при стандартни условия: DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС за 24ч. След това средата се сменя с DMEM с добавени антибиотици и 1% ITS . След 7-10 дни клетките достигат необходимата плътност от около 85% и в средата се включва 50ng/ml PDGF-BB за 48ч. Използва се само тази концентрация на РФ, тъй като резултатите от предишните ни експерименти демонстрират, че тя е оптималната по отношение на клетъчната пролиферация. Поради тази причина се изследва именно

ефектът на тази концентрация и върху експресията на маркери. Контролните клетки се култивират в DMEM с добавени антибиотици и 1% ITS без РФ. Хранителната среда се подменя всеки втори ден до провеждането на експеримента.

Прави се флоуцитометричен анализ за следните маркери:

- CD105
- CD146
- COL1a2
- COL3a1
- BSPII
- SPARC

Някои от изброените маркери се експресират на клетъчната повърхност, а други – във вътрешността на клетката. Поради тази причина се използват два различни протокола за флоуцитометрия: съответно за повърхностни маркери и за вътрешноклетъчни.

За негативна контрола се използва маркер, който не се експресира от МСК-CD4.

**В експеримента се използват:**

- PBS
- 0,05% трипсин/ЕДТА
- Пластмасови епруветки от 15мл
- 2% BSA
- Комплект от 3 реагента PerFix-nc (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland) (използва се само при изследване експресията на вътрешноклетъчните маркери)
- Моноклонални антитела произведени в мишка или в заек:
  Анти-CD 105/ендоглин IgG (Santa Cruz)

Анти-CD 146 IgG моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, САЩ)

Анти-COL1a2 IgG (Santa Cruz)

Анти-COL3a1 IgG (Santa Cruz)

Анти-BSPII IgG (Santa Cruz)

АнтиSPARC IgG (Santa Cruz)

Анти-CD 4-FITC моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland)

За визуализиране на първичните антитела, които не са директно свързани с флуорохром, се използват следните вторични флуоресцентни антитела:

- Козе анти-мише антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 488 IgG
- Магарешко анти-заешко антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 568 IgG.

**Протокол за белязане на повърхностни маркери (без пермеабилизаране на клетъчната мембрана):**

- Клетките в културелния съд се измиват с PBS за 5 мин.
- Инкубиране с 2ml 0,05% трипсин/ЕДТА за 10 мин.
- Разпределяне на клетките по равен брой в пластмасови епруветки
- Третиране с разтвор на 2% BSA в PBS, за да бъдат блокирани неспецифичните места за свързване на антителата. Пропускането на тази стъпка може да доведе до фалшиво позитивни резултати
- Измиване на клетките с PBS за 5 мин.
- Инкубиране на клетките за 30 мин. на стайна температура ($19^{o}$-$25^{o}$C) с първичното антитяло, предварително разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:250

- Антитяло CD146, което е директно конюгирано с флуорохром, се разрежда в 2% BSA-PBS в съотношение 1:1000; инкубира се също за 30 мин. на стайна температура
- Измиване на клетките, белязани с моноклонални антитела (неконюгирани с флуорохром) с PBS за 5 мин.
- Маркиране на първичните моноклонални антитела, неконюгирани с флуорохром чрез инкубиране с вторични, конюгирани с флуоресцентен маркер за 20 мин. на тъмно
- След всяко измиване, клетките се центрофугират за 4 мин. на 3000 оборота/мин.

**Протокол за белязане на вътрешноклетъчни маркери, чрез клетъчно пермеабилизиране:**

- Използван е PerFix-nc Kit (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland) , съгласно инструкциите на производителя. Комплектът включва 3 реагента: буфер №1 Фиксиращ реагент, буфер №2 Пермеабилизиращ реагент и буфер №3 Финален разтвор.
- Клетките в културелния съд се измиват с PBS за 5 мин.
- Инкубиране с 2ml 0,05% трипсин/ЕДТА за 10 мин.
- Отлепените клетки се ресуспендират в 50µL PBS
- Добавяне на 5µL от буфер №1 и щателно разбъркване
- Инкубиране за 15 мин.
- Добавяне на 300µL от буфер №2 заедно с първичното антитяло (разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:250)
- Инкубиране за 30 мин.
- Прибавяне на вторичното антитяло, конюгирано с флуорохром (разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:1000)
- Инкубиране за 15 мин.

- Прибавяне на буфер №3 разреден в PBS до получаване на краен обем 1ml

Клетки се изследват с Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland) и анализират с Kaluza Analysis Software Cytometer (Beckman Coulter International SA).

### IV.2.4.Изследване ефекта на PDGF-BB върху колагеновия синтез

#### IV.2.4.1.Количествено определяне на тоталния разтворим колаген

Клетки от 1-ви до 3-ти пасаж се засяват в 12-ямкови плаки (TPP®, Трасадинген, Швейцария) с гъстота 10 000 клетки/$cm^2$. Те се култивират при стандартни условия: DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС за 24ч. На следващия ден средите се сменят с DMEM с добавени антибиотици, 1% ITS и една от следните концентрации на РФ PDGF-BB: 10ng/ml и 50ng/ml. Средата, в която не се добавя РФ служи като контрола. Клетките се култивират за една седмица.

С този експеримент се изследва количеството разтворим колаген, синтезиран от клетките и секретиран в хранителната среда (супернатанта) над клетъчния слой. За целта се използва Sircol Collagen Assay Kit (Biocolor Ltd, Carrickfergus, United Kingdom) съгласно инструкциите на производителя. Китът съдържа следните компоненти:

- Dye Reagent-оцветяващ реагент-съдържа боята Sirius Red в пикринова киселина; има способността да се свързва неспецифично към колагена, т.е. без да различава отделните типове колаген
- Alkali Reagent-основен реагент-съдържа 0.5M натриев хидроксид; освобождава излишъка от оцветяващия реагент от комплекса с колагена

- Reference Standart-Стандарт от киселинно разтворим колаген тип I в 0.5M оцетна киселина; използва се за оформянето на стандартната крива, необходима за анализа на резултатите
- Acid-salt Wash Reagent-съдържа концентрирана оцетна киселина, натриев хлорид и сърфактанти
- Acid Neutralising Reagent-киселиннонеутрализиращ реагент; съдържа TRIS-HCL и натриева основа
- Collagen isolation & Concentration Reagent-съдържа полиетилен гликол и TRIS-HCL буфер, pH 7.6
- Пластмасови конични епруветки тип Епендорф за микроцентрофуга с обем 1.5ml

Към 100µl от супернатантата се добавя 1ml Sircol Dye Reagent. Пробите се инкубират за 30 мин. на стайна температура. След това се центрофугират за 10 мин. на 13000 оборота/мин. Течната фракция се отстранява, а към преципитата се прибавя 750µl Acid Salt Wash. Следва второ центрофугиране за 10 мин. на 13000 оборота/мин. Преципитатът се разтваря в 250µl Alkali Reagent. Пробите се прехвърлят в 96-ямкова плака и анализират на апарат за спектрофотометричен анализ Micro Plate reader (Varioscan, Thermo, USA) (*Фиг. 5*). Флуоресценцията се отчита при дължина на вълната от 555nm.




*Фиг. 5 Спектрофотометър Micro Plate reader (Varioscan, Thermo, USA)*

**IV.2.4.2.Изследване активността на лизил оксидаза (lysyl oxidase-LOX).**

Клетки, изолирани от ПДЛ (между 1-ви и 4-ти пасаж) се засяват в 12-ямкови плаки с гъстота 10 000 клетки/$cm^2$. Те се култивират при стандартни условия: DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС за 24ч. След този период средата се сменя с безсерумна, която съдържа 1% ITS. Към хранителната среда се добавя и по една от следните концентрации на РФ PDGF-BB: 1ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml. Клетки, третирани в среда само с ITS без РФ служат за контрола.

Клетките се култивират в продължение на една седмица.

Активността на ензима LOX в супернатантата/ хранителната среда се изследва с кита Lysyl Oxidase Activity Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK). При провеждането на експеримента и отчитането на резултатите се спазват стриктно инструкциите на производителя, описани в ръководството към кита.

Като стандарт, спрямо чиято концентрация да се отчита количествено LOX в изследваните проби се използва Recombinant Human Lysyl Oxidase Homolog 2 Protein (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Китът съдържа:

- Компонент А-HRP Substrate
- Компонент Б-буферен разтвор
- Компонент В-Horseradish Peroxidase
- Компонент Г-диметилсулфоксид

Реагентите се подготвят за експеримента според препоръките на производителя.

**Протокол**:

- Приготвя се смес от компоненти А, Б и В с краен обем 5.040ml – т.нар. „мастермикс”
- По 50µl от изследвата хранителна среда или стандарт се инкубират с по 50µl мастермикс при температура 37$^{o}$C за 30 мин. на тъмно
- Флуоресценцията се отчита с апарат Micro Plate reader при дължина на вълната Ex/Em = 540/590nm

Количествено определяне на LOX става след преизчисляване количеството на ензима спрямо количеството общ белтък в пробите. Общият белтък се определя чрез тест на Брадфорд. Използва се Bradford

Reagent (Sigma-Aldrich) съобразно инструкциите на производителя. Тестът се основава на способността на боята Brilliant Blue G да се свързва и да образува комплекси с всички протеини в пробата. Тестът е колориметричен. Колкото по-голямо е количеството протеин в дадена проба, толкова по-интензивен и тъмен е цветът след оцветяване с реагента на Брадфорд. За отчитането на този тест е необходимо използването на стандарти, чийто протеинови концентрации са известни. Като стандарт с известна концентрация в провежданите експерименти служи BSA.

### IV.2.5.Изследване влиянието на PDGF-BB върху остеогенната диференциация на стволови клетки от периодонтален лигамент

#### IV.2.5.1.Изследване на алкалнофосфатазната (alkaline phosphatase-ALP)-активност

Клетки от 1-ви до 3-ти пасаж се засяват в 12-ямкови плаки с гъстота 10 000 клетки/$cm^2$. Те се култивират най-напред при стандартни условия: DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС за 24ч. На следващия ден средите се сменят с DMEM с добавени антибиотици, 1% ITS и една от следните концентрации на РФ PDGF-BB: 10ng/ml и 50ng/ml. Средата, в която не се добавя РФ послужи като контрола. Клетките се култивират за една седмица. Хранителната среда се сменя на всеки 2-ри или 3-ти ден. На 7-мия ден се изследва ALP-активност едновременно в супернатантата и в клетъчния слой.

ALP има способността да катализира хидролизата на фосфатните естери до алкални буфери. Образуват се органични радикали и неорганични фосфати. Експериментът се отчита с Alkaline Phosphatase Assay Kit (Fluorometric) (Abnova, Taipei, Taiwan) съобразно инструкциите на производителя. Ефективността му се базира на способността на ALP да

отделя фосфатните групи от нефлуоресцентния 4-метилумбелиферил фосфат динатриева сол – 4-Methylumbelliferyl phosphate disodium salt (MUP) substrate. В резултат се получава интензивно флуоресцентен сигнал.

Китът съдържа:

- 100ml ALP пробен буфер
- MUP субстрат
- ALP ензим
- 25ml Финален/стоп-разтвор

Реагентите се подготвят за експеримента според препоръките на производителя.

**Протокол**:

- Клетките и супернатантата (поотделно) се хомогенизират в 100µl от ALP пробен буфер
- Центрофугиране за 3 мин. на 13 000 оборота/мин. за отстраняването на утаената неразтворима фракция
- Преместване на пробите в 96-ямкова плака
- Прибавяне на 20µl от финалния разтвор
- Приготвяне на MUP стандарт и добавянето му в 96-ямкова плака в следните концентрации 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5nMol на ямка
- Прибавяне на 10µl ALP ензим във всяка от ямките, съдържаща MUP стандарт
- Инкубиране за 30 мин. на стайна температура и на тъмно
- Анализиране на резултата с Micro Plate reader; флуоресценцията се отчита при дължина на вълната от 440nm
- Изчисляването на ALP активност се извършва по следната формула, предложена от производителя:

ALP активност = A / V / T (mU/ml), където A е количеството 4-метилумбелиферил (отчетено в nMol), V е обемът проба във всяка ямка (в ml), T е времето, необходимо за реакциите (в мин.).

Количествено ALP се изчислява спрямо количеството общ белтък в пробите. Общият белтък се определя чрез тест на Брадфорд. Използван е Bradford Reagent (аналогично на предходния експеримент) съобразно инструкциите на производителя. Тестът се основава на способността на боята Brilliant Blue G да се свързва и да образува комплекси с всички протеини в пробата.

### IV.2.5.2.Цитохимично оцветяване на калциевите отлагания с Alizarin red.

Клетки от 1-ви до 3-ти пасаж се засяват в 12-ямкови плаки с гъстота 10 000 клетки/$cm^2$. Култивират се при стандартни условия най-напред: DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС за 24ч. След това хранителната среда се подменя с DMEM с добавени антибиотици, включително 1% ITS и една от следните концентрации на РФ PDGF-BB: 1ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml. Клетки, третирани в среда само със среда и ITS служат за контрола. Клетките се култивират в продължение на 3 седмици. Хранителната среда се сменя всеки 2-ри или 3-ти ден.

За извършването на експеримента се използва Alizarin Red S (AppliChem) в концентрация 2g/ml, приготвен според инструкциите на производителя.

**Прилага се модифициран протокол на Gregory и съавт. (117):**

- Аспириране на хранителната среда
- Измиване на клетките с PBS триктатно
- Оцветяване с 2g/ml alizarin red S за 5-10 мин.
- Измиване с PBS трикратно

- Оцветените препарати се снимат макроскопски (наблюдават се с просто око) и се наблюдават с фазово-контрастен микроскоп (Leica, DMRE, Leica Microsystems GmbH, Germany).

Клетките се отделят чрез третиране с 0,05% трипсин/ЕДТА за 15 мин. Пробите се прехвърлят в 96-ямкова плака и анализират на Micro Plate reader. Флуоресценцията се отчита при дължина на вълната от 555nm.

### IV.2.6.Статистически анализ

За всеки един от експериментите в настоящия научен труд са проведени от 3 до 7 независими повторения.

- Дескриптивна статистика

  средна аритметична – за оценка на централната тенденция;
  стандартно отклонение – за оценка на разсейването;
  графично представяне на резултатите.

- Оценка на параметри – доверителен интервал на средната аритметична.

- Метод на повторно вземане на проба – многократни повторения (Bootstrap methods) – за по-точна оценка на доверителните интервали. Методът може да се прилага при по-малък обем извършени проби.

  Т-тест – при сравняване на две независими групи.
  Т-тест – при сравняване на две зависими групи (повторни измервания).

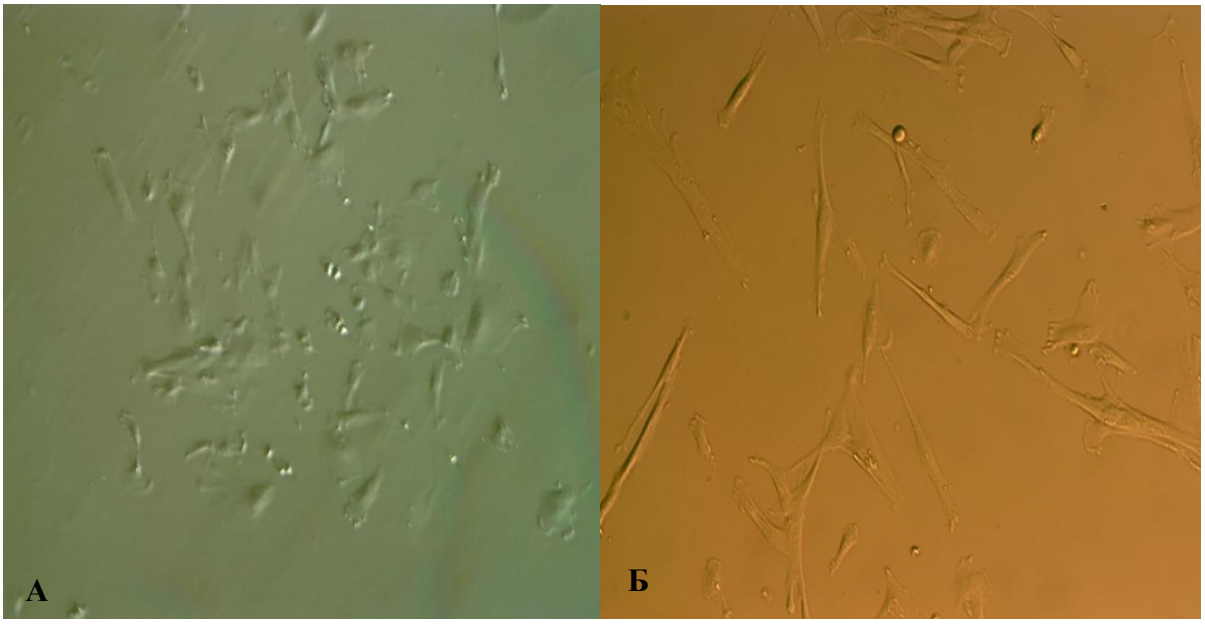
Използваното критично ниво на значимост е α=0,05. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато Р стойността (P-value) е по-малка от α. За обработка на данните от проучването е използван специализирания статистически пакет SPSS версия 13.0.

# V.РЕЗУЛТАТИ

## V.1.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 1

**Изолиране и *in vitro* култивиране на МСК от ПДЛ на постоянни зъби.**

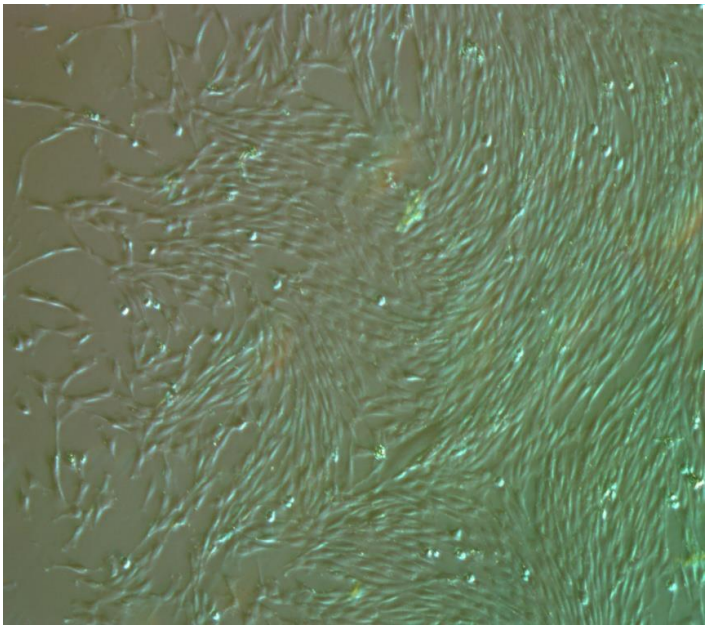
Тъканните експлантати се изолират от средната трета на кореновата повърхност на интактни трети молари. След ензимната обработка на ПДЛ се получава суспензия от единични клетки. Средно около 3-4 дни след посяването на лизираните тъканни експлантати започват да се наблюдават първите единични адхезирали клетки към дъното на пластмасовите петрита. При наблюдение с фазово-контрастен микроскоп се установява наличието на малки клетки с фибробластоподобна морфология- вретеновидна и звездовидна форма (*Фиг. 6 А*, *Б*).



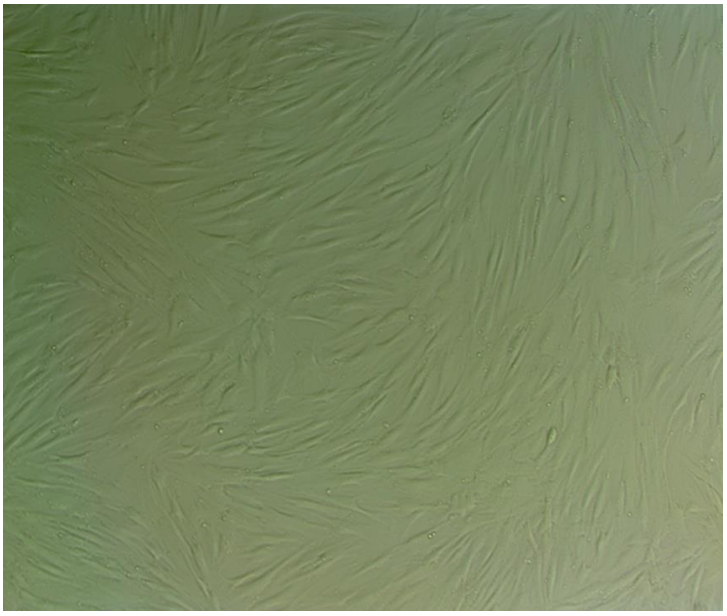

*Фиг. 6 А,Б Фазово-контрастни светлинномикроскопски снимки, представящи морфологията на клетки, изолирани от ПДЛ. Увеличение А-х50, Б-х200.*

В рамките на 7-10 дни се наблюдава оформянето на първите колонии. Те се формират в резултат на интензивното делене на отделните адхезирали клетки по дъното на петрито. Клетките имат изразен пролиферативен капацитет и след 2 до 3 седмици колониите започват постепенно да се сливат, образувайки плътен конфлуентен слой (*Фиг. 7 и Фиг. 8*).

От фазово-контрастните светлинно-микроскопски изображения се установява, че с увеличаване на конфлуентността, клетките променят своята морфология. В първите дни след засяването им, пространствата между клетките са по-големи и те имат по-добре изразена звездовидна форма. В следващите дни клетъчният монослой става по-плътен с по-малки пространства между клетките. Така последните придобиват удължена вретеновидна форма. Тази промяна във формата на клетката не инициира процеси на клетъчна диференциация. Тя е резултат от значително увеличената митотична активност и бързо нарастналия брой клетки.



*Фиг. 7 Фазово-контрастни светлинномикроскопски снимки, представящи клетки, изолирани от ПДЛ; клетките формират плътен конфлуентен слой след култивиране в продължение на 2 до 3 седмици. Увеличение x50*



*Фиг. 8 Фазово-контрастни светлинномикроскопски снимки, представящи клетки, изолирани от ПДЛ; клетките формират плътен конфлуентен слой след култивиране в продължение на 2 до 3 седмици. Увеличение x100*

Успешно усвоената техника ни позволява постоянно получаване на първични клетъчни култури от ПДЛ в рутинната лабораторна практика. Част от клетките могат да бъдат замразени в течен азот и да се използват за експериментални цели на по-късен етап. Наши собствени наблюдения показват, че криопрезервацията не смущава свойствата на стволовите клетки.

## V.2.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 2

**Характеризиране на клетките, изолирани от ПДЛ чрез изследване експресията на маркери с методите на флоуцитометричен и имунофлуоресцентен анализ.**

Изолираните клетки са характеризирани с количествени и качествени методи. Характеризирането се реализира чрез доказване експресията на два типа маркери:

-стволовоклетъчни маркери, асоциирани с клетки, които имат различен ембрионален тъканен произход

-маркери, асоциирани с процеси на синтез и минерализация

Резултатите потвърждават хипотезата, че в човешки ПДЛ има клетъчен резерв от недиференцирани МСК. Освен клетки с антигенна характеристика на плурипотентни мезенхимни клетки, се установи и наличие и на такива, които имат колагенсинтезираща и минералпродуцираща функция. По този начин се доказва, че изследваната клетъчна популация е хетерогенна, но количествено в нея преобладават МСК.

**1.Флоуцитометричен анализ:** чрез този метод се прави количествена оценка на това, какъв процент от клетките в хетерогенната култура експресира търсените маркери. Изследва се експресията на маркери, типични за ембрионални и недиференцирани МСК: CD44, CD49f, CD105, CD117, CD271, STRO-1.

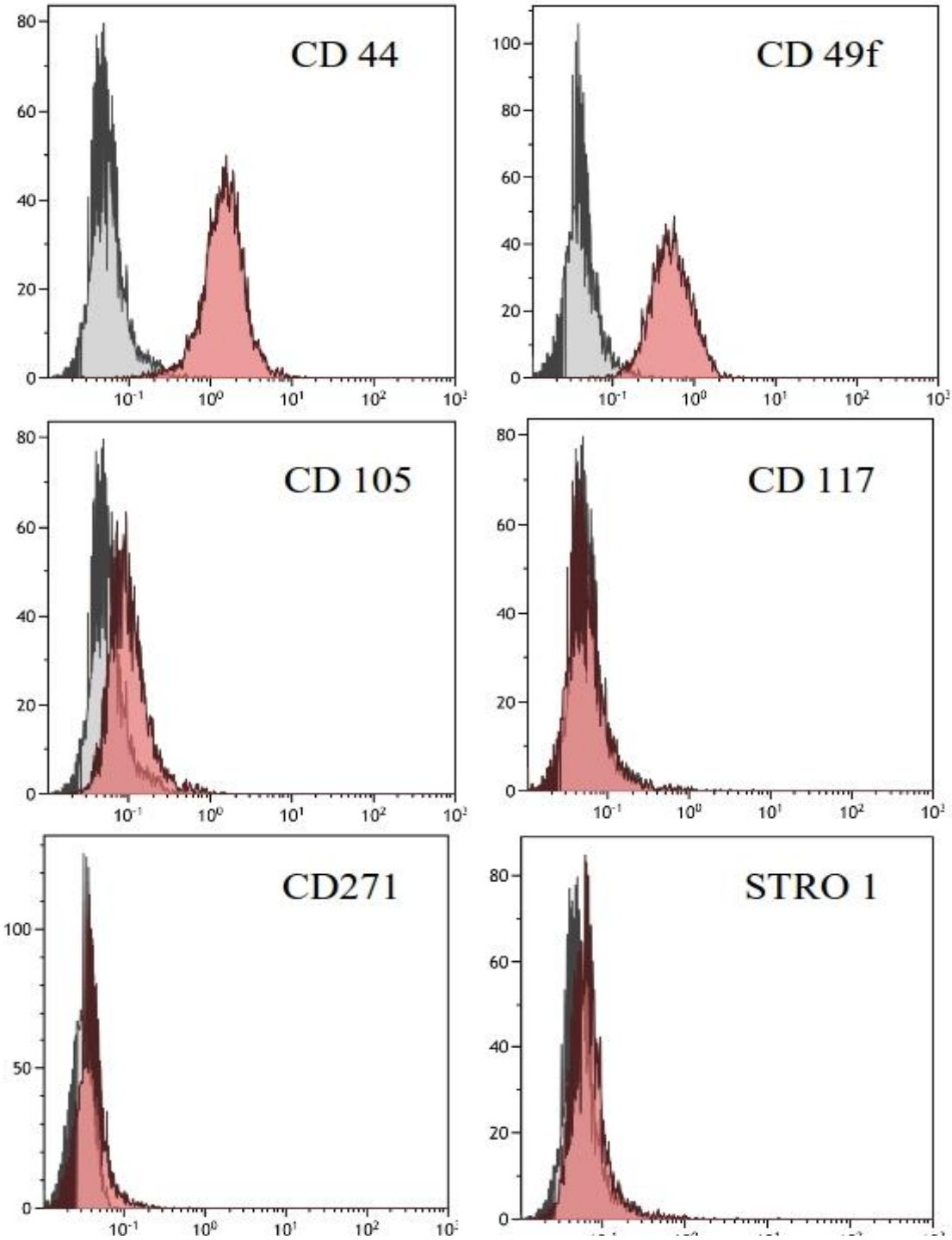
Резултатите показват, че CD44 се експресира в 99,8% ± 0,06%, CD49f-в 97,5% ± 0,87%, CD105-в 35,14% ± 3,2%, CD117-в 5,5% ± 1,29%, CD271-в 7,6% ± 1,6%, STRO-1-в 4,3% ± 0,7%. Хистограмите, изразяващи

експресията на съответните маркери спрямо негативната контрола са представени на *Фиг. 9*.

Статистическият анализ на данните е представен в *Таблица 1*.

В литературата все още няма описан маркер, който е универсален и доказано да се експресира при всички МСК с различен тъканен и органен произход. Поради тази причина характеризирането на хетерогенната клетъчна култура от ПДЛ в настоящото изследване става на базата на няколко различни повърхностни маркера. Всеки от тях доказано се експресира в стволови клетки от тъкани с различен ембрионален произход.

Трите маркера с най-висока експресия при изследваните от нас периодонтални МСК са CD44, CD49f и CD105. Високата експресия на три маркера е достатъчно условие, за да се твърди, че получената култура е съставена основно от МСК. Останалите маркери също се експресират от клетките в ПДЛ, но в по-ниска степен. Изясняването и доказването на стволовоклетъчния фенотип е задължителен етап в началото на експерименталната работа с МСК.




*Фиг. 9 Флоуцитометричен анализ на клетки, изолирани от ПДЛ. Всички изследвани стволовоклетъчни макрери се експресират от клетките. CD44 се експресира в 99,87% ± 0,07%, CD49f – в 97,79% ± 0,65%, CD105 – в 35,14% ± 3,66%, CD117 – в 5,52% ± 1,45%, CD271 – в 8,22% ± 0,95%, STRO-1 – в 4,34% ± 0,82%. Клетки, неоцветени с маркери се използват за негативна контрола.*

*Експресия*

*Негативна контрола*

*Таблица 1 Разпределение на резултатите от статистическия анализ според вида на статистическия показател и експресията на изследваните маркери. Средната стойност на експресията на маркерите и контролите е изразена в проценти.*

| Статистически показател / Изследван маркер | Средна стойност | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Експресия на маркер | Контрола | Експресия на маркер | Контрола | Експресия на маркер | |
| CD44 | 1,40 | 99,87 | 0,38 | 0,07 | 1,06-1,72 | 99,81-99,92 | <0.001 |
| CD105 | 1,40 | 35,14 | 0,38 | 3,66 | 1,06-1,72 | 32,35-38,31 | <0.001 |
| CD117 | 1,40 | 5,52 | 0,38 | 1,45 | 1,06-1,72 | 4,21-6,77 | <0.001 |
| STRO-1 | 1,40 | 4,34 | 0,38 | 0,82 | 1,06-1,72 | 3,67-5,03 | <0.001 |
| CD49f | 0,75 | 97,79 | 0,13 | 0,65 | 0,63-0,86 | 97,27-98,23 | <0.001 |
| CD271 | 0,39 | 8,22 | 0,19 | 0,95 | 0,22-0,51 | 7,47-9,03 | <0.001 |

Контрола = негативна контрола от клетки, неоцветени с маркери

## 2.Имунофлуоресценция на хетерогенна култура от клетки, изолирани от ПДЛ

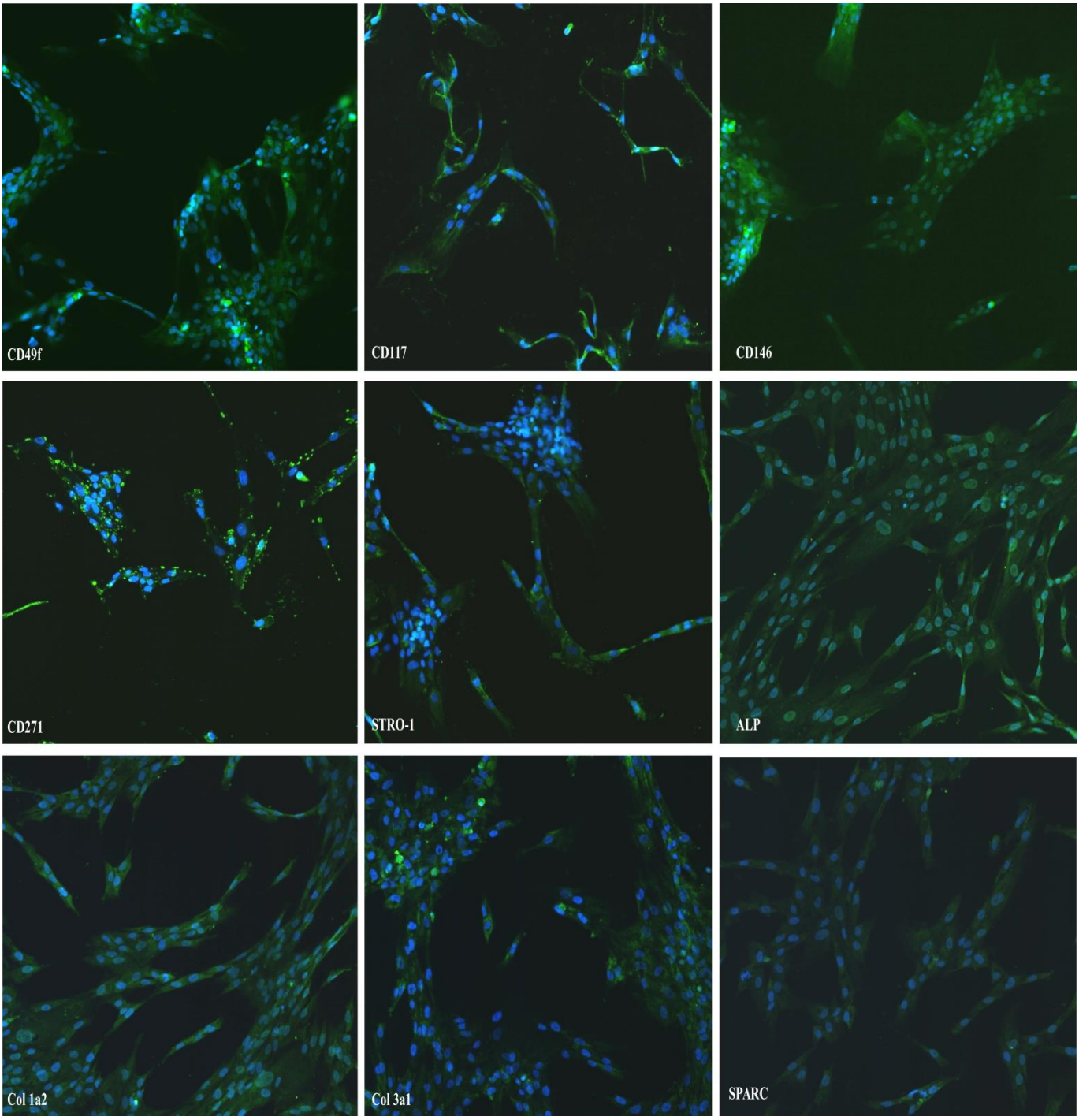
Чрез този метод се прави качествена оценка на способността на клетки, изолирани от ПДЛ да експресират повърхностни и вътрешноклетъчни маркери (*Фиг. 10, Фиг. 11*). Някои от използваните маркери потвърждават стволовоклетъчния характер на клетките, а други са свързани със синтез на ЕЦМ и процеси на минерализация.

Клетките реагират положително, както при оцветяване със стволовоклетъчни маркери, така и с маркери, които са характерни за минерал-продуциращи тъкани и за два от най-разпространените типове колаген. Изображенията, получени при този експеримент потвърдават наличието на МСК в човешки ПДЛ.

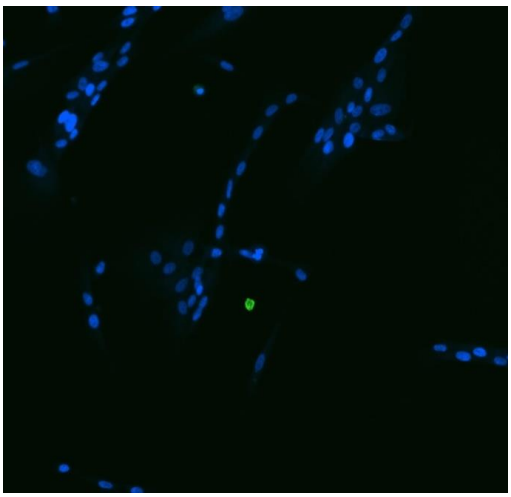
Експресията на отделните маркери не е еднаква при всички клетки в културата. Това става ясно при анализ на резултатите от имунофлуоресценцията. Има клетки, при които оцветяването за дадено антитяло е значително по-интензивно в сравнение с други клетки в същия препарат. Това е свързано с факта, че изследваната клетъчна култура е хетерогенна.

Позитивната експресия на диференциационни маркери (колагенови, ALP) доказва, че тези клетки имат потенциал да поемат по пътя на диференциация и синтез на ЕЦМ при подходящи условия.

Всички маркери, включени в опитната постановка се експресират и от стволови клетки, произхождащи от НЕзъбни тъкани. Следователно, клетките от ПДЛ са способни да се диференцират едновременно до клетки, типични за лицево-челюстната област, както и до такива, с „далечен“ тъканен произход и локация. Пътят, по който ще поеме клетката (диференциация или дедиференциация) основно зависи от условията на микросредата.




*Фиг. 10 Имунофлуоресценция на клетки, изолирани от ПДЛ, белязани със стволовоклетъчни и диференциационни маркери. Увеличение x50.*



*Фиг. 11 МСК от ПДЛ – контрола от клетки, оцветени само с DAPI за визуализиране на клетъчното. Увеличение x50.*

## V.3.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 3

**Изследване влиянието на РФ PDGF-BB върху клетъчния цикъл и пролиферацията на клетки от ПДЛ.**

### 1.Изследване на клетъчен цикъл

След засяването на клетките в плаката се изчаква период от 24ч.-време, необходимо за тяхната адхезия по дъното на съда за клетъчно култивиране. Унифициране на жизнения цикъл на клетките се постига при култивирането им за 24ч. в среда с минимално количество серум. Така те преминават в една и съща фаза на клетъчен цикъл. Едва след това се култивират за период от 48ч. в условия с добавен PDGF-BB в концентрация 50ng/ml и различно процентно съдържание на серум. Установено е, че именно 48ч. е времето, необходимо за удвояване на клетъчната популация при клетки, изолирани от ПДЛ (284).

Интензивността на флуоресценция на клетките след третирането им с реагента от приложения в експеримента кит, дава информация за количеството ДНК в тях. По време на фазите G0/G1 в клетъчното ядро се съдържат по две копия от всяка хромозома. През S-фазата се инициира процес на репликация. Количеството ДНК започва да се увеличава и при G2/M-фазата то вече е два пъти повече в сравнение с G0/G1. Следва разделяне на клетката.

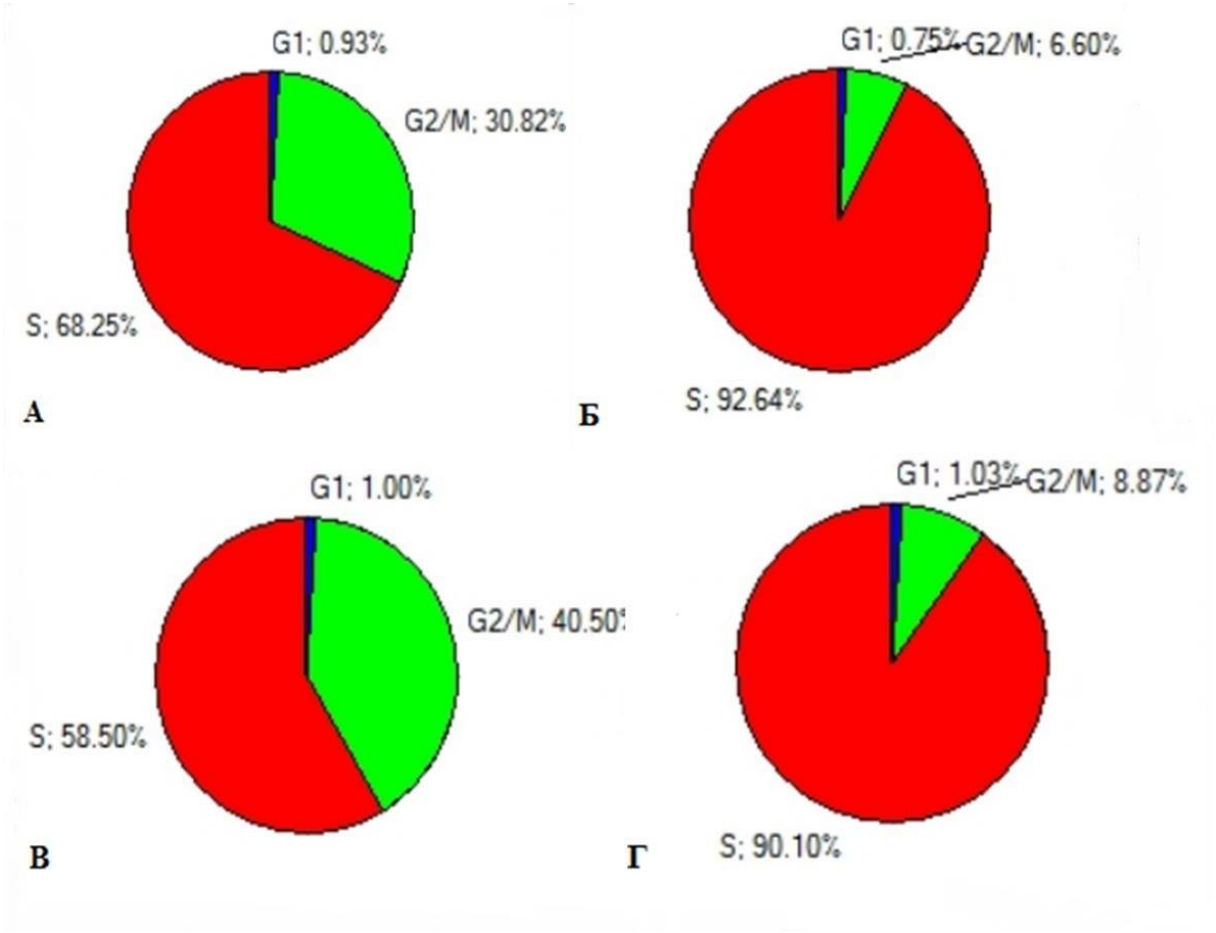
Изследва се влиянието на 4 различни типа хранителна среда върху клетъчния цикъл.

Типове хранителна среда:

- DMEM+10% ФТС;
- DMEM+0,1% ФТС;

- DMEM+10% ФТС + 50ng/ml PDGF-BB ;
- DMEM+0,1% ФТС + 50ng/ml PDGF-BB.

Резултатите от разпределението на клетките по фазите на клетъчния цикъл след третиране със съответните среди са представени на *Фиг. 12*.




*Фиг. 12 Разпределение на клетки, изолирани от ПДЛ по фазите на клетъчния цикъл. В синьо е обозначена G1-фаза, в червено – S-фаза, в зелено – G2/M-фазите. А - клетки, отглеждани в DMEM + 10% ФТС, Б - клетки, отглеждани в DMEM + 0,1% ФТС, В - клетки, отглеждани в DMEM + 10% ФТС + 50 ng/ml PDGF-BB, Г - клетки, отглеждани в DMEM + 0,1% ФТС + 50 ng/ml PDGF-BB.*

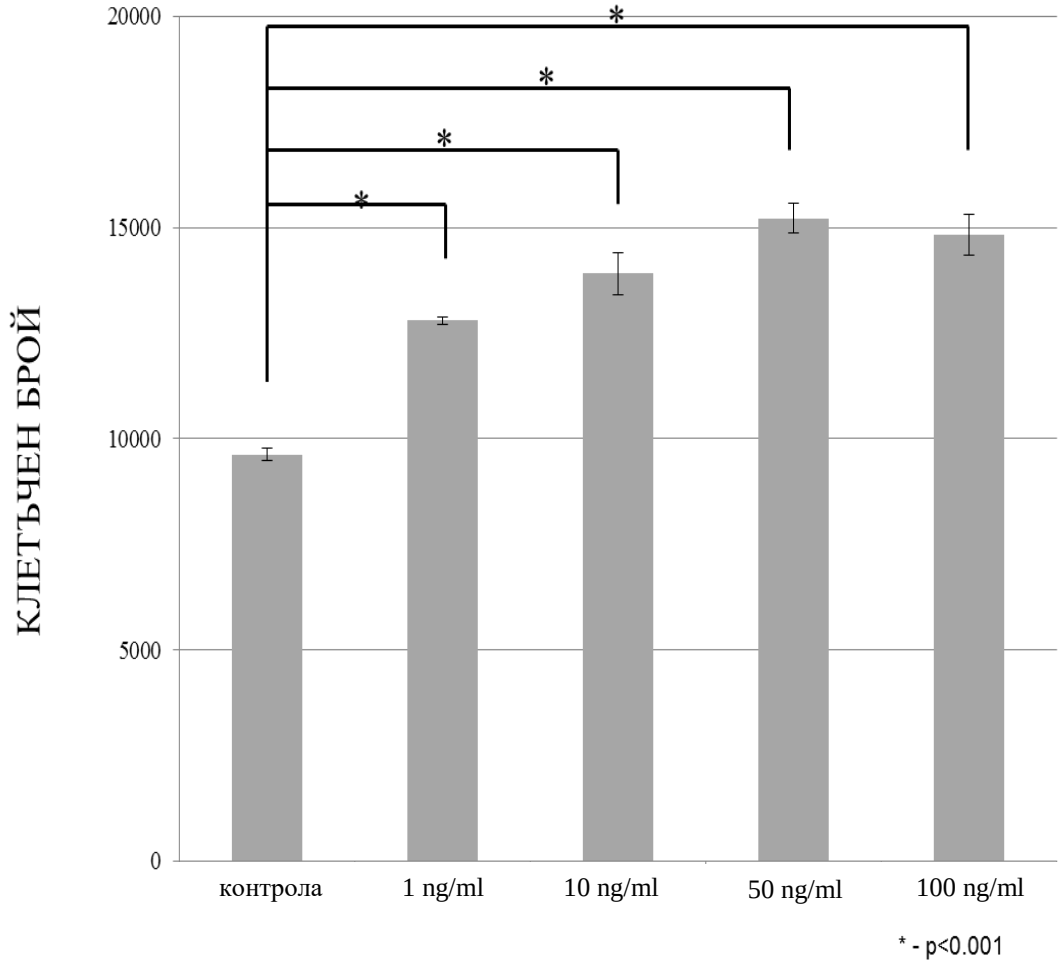
На *Фиг. 12* се вижда процентното разпределение на клетките по фазите на клетъчния цикъл в зависимост от условията, в които са отглеждани. Сравнявайки фигура *Фиг. 12А* и фигура *Фиг. 12Б* се установява, че наличието на 10% ФТС в средата значително увеличава процента клетки, които са в митотична фаза (G2/M - фаза), т.е. активно делящи се клетки в сравнение със среда, която съдържа минимално количество ФТС (0,1%). Сравнявайки *Фиг. 12А* и *Фиг. 12В* става ясно, че наличието на 50ng/ml PDGF-BB в среда с 10% ФТС увеличава още повече процента на делящите се клетки. Прибавянето на РФ в условия на минимално количество ФТС (0,1%) (*Фиг. 12Г*) от своя страна също стимулира клетъчното делене в сравнение в клетки, култивирани в среда, която съдържа само 0,1% ФТС (*Фиг. 12Б*). Резултатите демонстрират, че прибавянето на PDGF-BB към средата за клетъчно култивиране винаги води до нарастване процента на активно пролифериращи клетки. Поради силния митогенен ефект на PDGF-BB върху стволовите клетки би следвало да участва активно в оздравителните процеси в ПДЛ.

**2.Изследване влиянието на PDGF-BB върху клетъчната пролиферация на МСКПДЛ.**

Резултатите от проведения тест за клетъчна пролиферация доказват, че PDGF-BB проявява силен митогенен ефект върху периодонтални МСК. Всички концентрации на РФ, включени в експерименталната постановка активират клетъчното делене при сравнението с контролни клетки, култивирани в среда без добавен PDGF-BB. Подобно на други активни молекули се установява, че PDGF-BB проявява силен концентрационнозависим ефект върху пролиферацията на стволовите клетки. От *Фиг. 13* става ясно, че с повишаване на концентрацията на PDGF-BB до 50ng/ml значимо се увеличава броя клетки, респ. стимулира

се клетъчната пролиферация. Петдесет ng/ml е оптималната концентрация за стимулиране на клетъчната пролиферация. При по-висока концентрация на РФ (100ng/ml) митогенният ефект започва слабо да се понижава.

*Таблица 2* съдържа резултатите от статистическия анализ.




*Фиг. 13 Увеличаване на броя стволови клетки, изолирани от ПДЛ след 48ч. инкубиране в хранителни среди с различни концентрации на PDGF-BB. Ефектът на РФ върху клетъчната пролиферация е дозозависим.*

*Таблица 2 Разпределение на резултатите от статистическия анализ според според вида на статистическия показател и ефекта от концентрацията на PDGF-BB върху клетъчната пролиферация.*

| Статистически показател / Концентрация на PDGF-BB | Средна стойност (брой клетки) | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | |
| 1ng/ml | 9623,7 | 12805,3 | 154,6 | 87,3 | 9503-9798 | 12750-12906 | <0.001 |
| 10ng/ml | 9623,7 | 13909 | 154,6 | 504,1 | 9503-9798 | 13411-14419 | <0.001 |
| 50ng/ml | 9623,7 | 15221 | 154,6 | 363,8 | 9503-9798 | 14820-15530 | <0.001 |
| 100ng/ml | 9623,7 | 14839,7 | 154,6 | 483,2 | 9503-9798 | 14400-15357 | <0.001 |

Контрола = клетки, които са култивирани в хранителна среда без добавен PDGF-BB

Високата активност на PDGF-BB в концентрация 50ng/ml се потвърждава и с проведения експеримент за установяване влиянието му върху разпределението на клетките по фазите на клетъчния цикъл. Независимо дали е включен в хранителна среда с или без ФТС, PDGF проявява силен ефект върху клетъчното делене. При високо процентно съдържание на серум е по-трудно да се установи индивидуалната роля на РФ, тъй като тогава не е елиминирано влиянието на другите активни молекули, съдържащи се във ФТС.

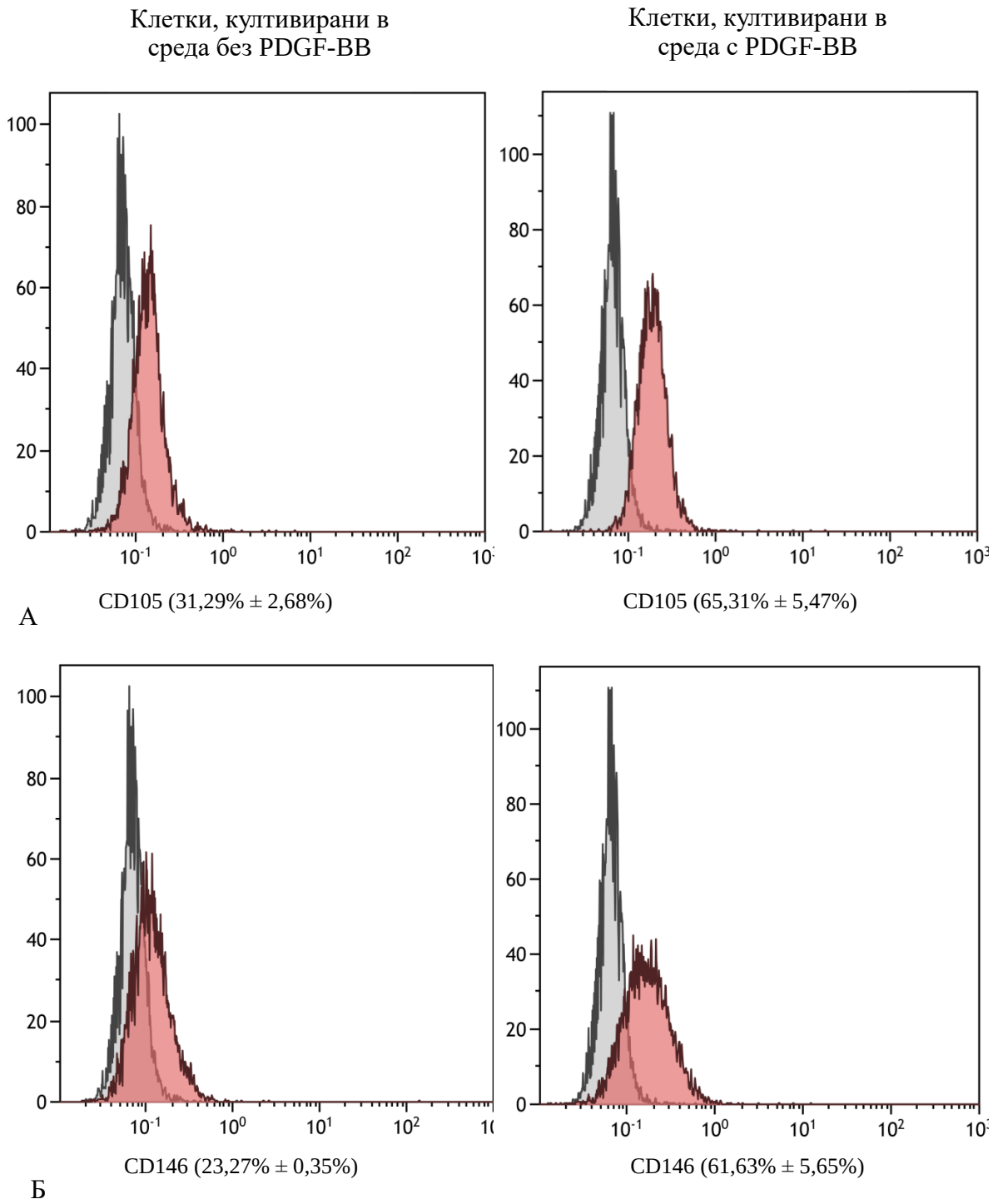
Клетъчната пролиферация е един от основните процеси, отговорни за реализирането на тъканната регенерация. PDGF-BB проявява висока активност върху изследваните клетъчни линии. Резултатите потвърждават значението му за поддържане на жизнеността на клетъчната популация и регенеративния потенциал в ПДЛ.

## V.4.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 4

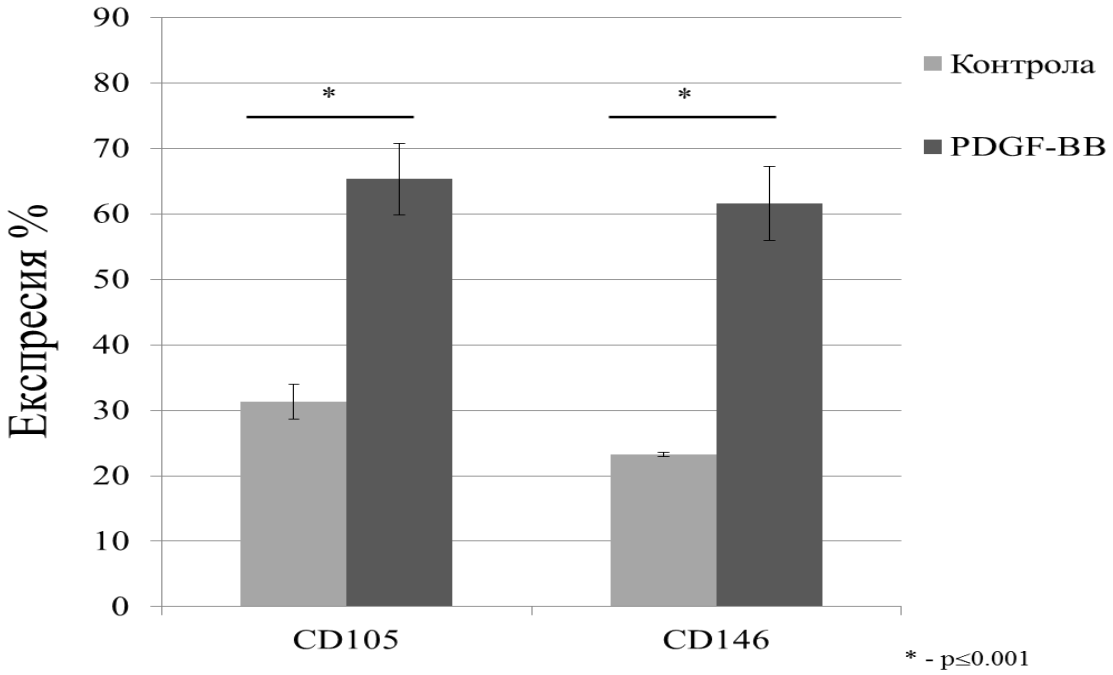
**Флоуцитометричен анализ на клетки от ПДЛ, доказващ ефекта на PDGF-BB върху експресията на стволовоклетъчни маркери.**

Клетки, изолирани от ПДЛ се култивират в условия на безсерумна среда с PDGF-BB в концентрация 50ng/ml и в такава без добавен РФ. Чрез флоуцитометричен анализ се установява влиянието на PDGF върху способността на клетките да експресират повърхностни стволовоклетъчни маркери. Избраните маркери са CD105 и CD146. Експресията на двата маркера, както за третираните с PDGF-BB стволови клетки, така и за нетретираните се сравнява най-напред с негативна контрола. Като такава послужиха клетки от ПДЛ, белязани с CD4. Този маркер не се очаква да бъде експресиран при изследваните клетъчни линии, независимо дали са култивирани в автокринна среда или в среда с РФ.

На *Фиг. 14* са показани хистограмите – резултат от флоуцитометричен анализ, които сравняват експресията на маркери спрямо негативна контрола; на *Фиг. 15* се сравнява експресията между клетки култивирани в среда с добавен PDGF-BB и такива, култивирани в среда без РФ. Резултатите от статистическата обработка на данните са дадени в *Таблица 3*.




*Фиг. 14 Флоуцитометричен анализ на клетки от ПДЛ, демонстриращ ефекта на PDGF-BB върху експресията на стволовоклетъчни маркери. Експресията на съответните маркери е съпоставена спрямо негативна контрола от клетки оцветени с антитяло CD4.*




*Фиг. 15 Експресия на стволовоклетъчни маркери при клетки от ПДЛ, култивирани в безсерумна среда с добавен PDGF-BB и сравнението им с клетки, култивирани в среда без PDGF-BB-контрола. PDGF-BB засилва експресията на стволовоклетъчните маркери CD105 и CD146.*

*Таблица 3 Разпределение на резултатите от статистическия анализ според вида на статистическите показатели и експресията на маркери при МСКПДЛ.*

| Статистически показател / Изследван маркер | Средна стойност (% експресия) | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | |
| CD105 | 31,29 | 65,31 | 2,68 | 5,47 | 28,34-33,56 | 59,44-70,28 | <0.001 |
| CD146 | 23,27 | 61,63 | 0,35 | 5,65 | 22,90-23,60 | 55,20-65,84 | <0.001 |

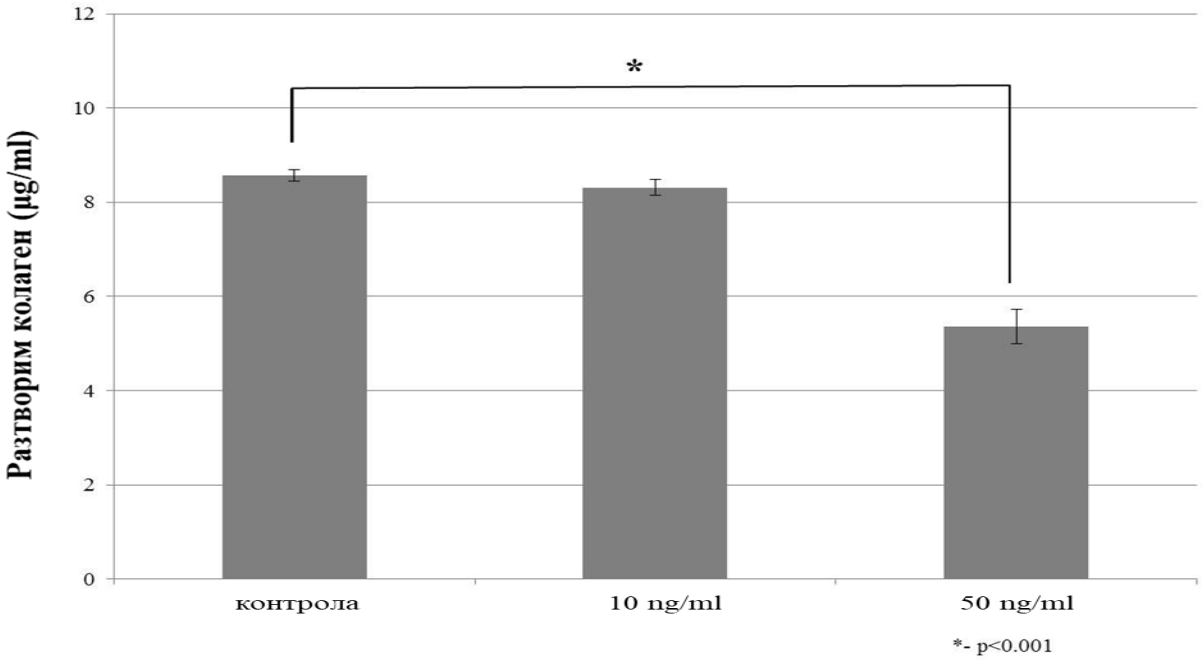
Контрола = експресия на маркери (CD105 и CD146) при клетки, култивирани в среда без PDGF-BB.

## V.5.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 5

### Определяне на колагеновия синтез, матурация и експресия на колагенови маркери след третиране на МСКПДЛ с PDGF-BB

### 1.Определяне количеството тотален разтворим колаген, отделен в хранителната среда на клетки от ПДЛ.

Функционалната активност на клетки, изолирани от ПДЛ за производство и секреция на общ колаген в хранителната среда се изследва посредством Sircol Collagen Assay Kit. Целта е да се установи какъв е ефектът на две различни концентрации на РФ PDGF-BB (10ng/ml и 50ng/ml), включени в хранителна среда без ФТС и да се сравни с контрола. Контролата представляват клетки, култивирани в безсерумна хранителна среда, в която не е включен РФ (0ng/ml PDGF-BB). Резултатите показват, че има концентрационнозависимо понижение в колагеновата продукция (*Фиг. 16*). При клетки, третирани с по-ниската концентрация на РФ (10ng/ml) не се наблюдава значима разлика в сравнение с контролата. При резултатите с 50ng/ml PDGF-BB вече се установява статистически значимо понижаване на колагеновия синтез. *Таблица 4* съдържа резултатите от статистическата обработка.




*Фиг. 16 Количество синтезиран и секретиран общ колаген в средата след 5-дневно култивиране на клетки, изолирани от ПДЛ третирани с различни концентрации на РФ.*

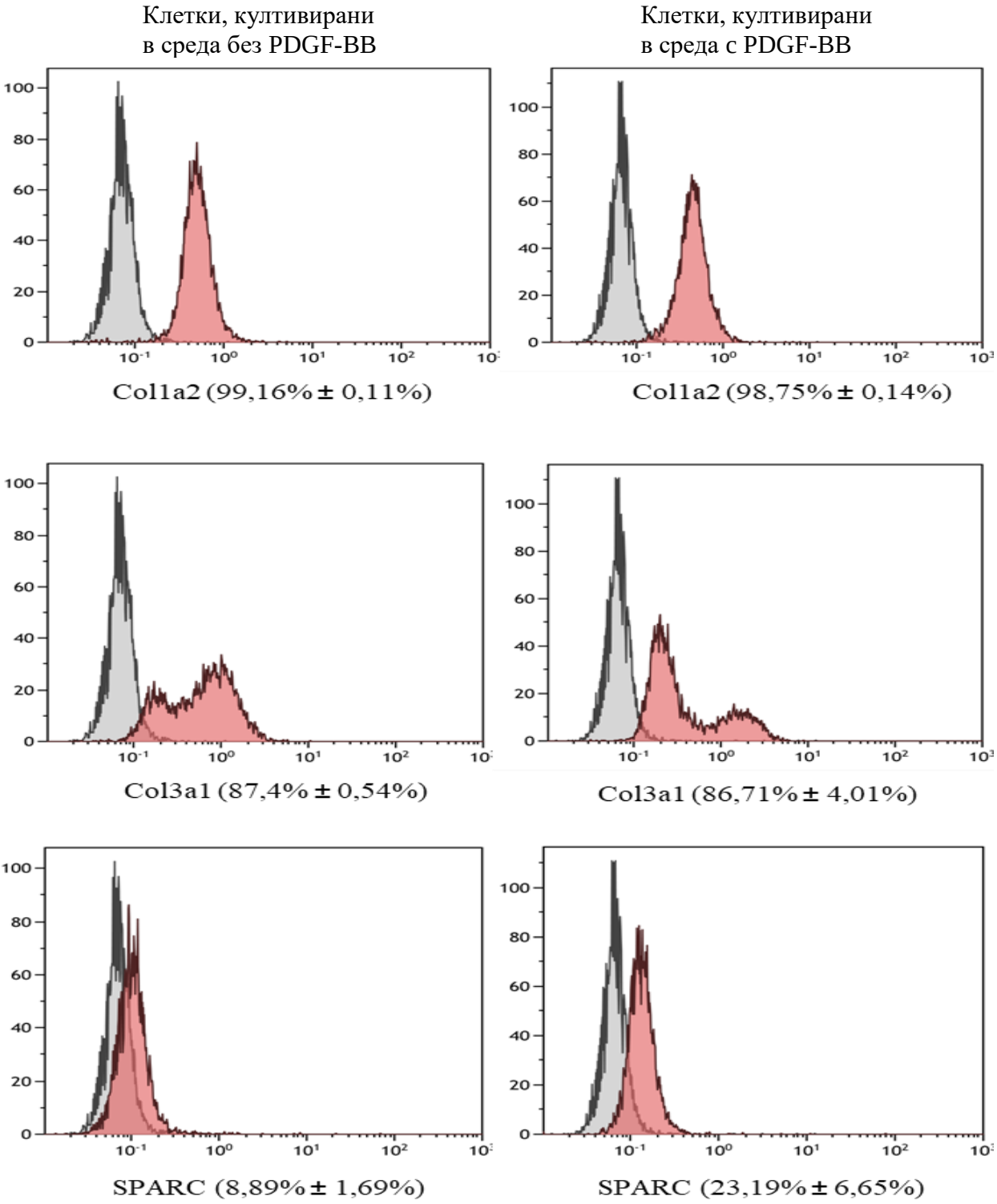
*Таблица 4 Разпределение на резултатите от статистическия анализ според вида на статистическите показатели и влиянието на концентрацията на PDGF-BB върху колагеновата продукция при МСКПДЛ.*

| Статистически показател / Концентрация на PDGF-BB | Средна стойност (общ колаген-µg/ml) | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | |
| 10ng/ml | 8,45 | 7,56 | 1,07 | 1,99 | 7,58-9,02 | 5,68-8,40 | 0.320 |
| 50ng/ml | 8,45 | 4,95 | 1,07 | 1,16 | 7,58-9,02 | 4,03-5,59 | <0.001 |

Контрола = клетки, култивирани в среда без добавен PDGF-BB

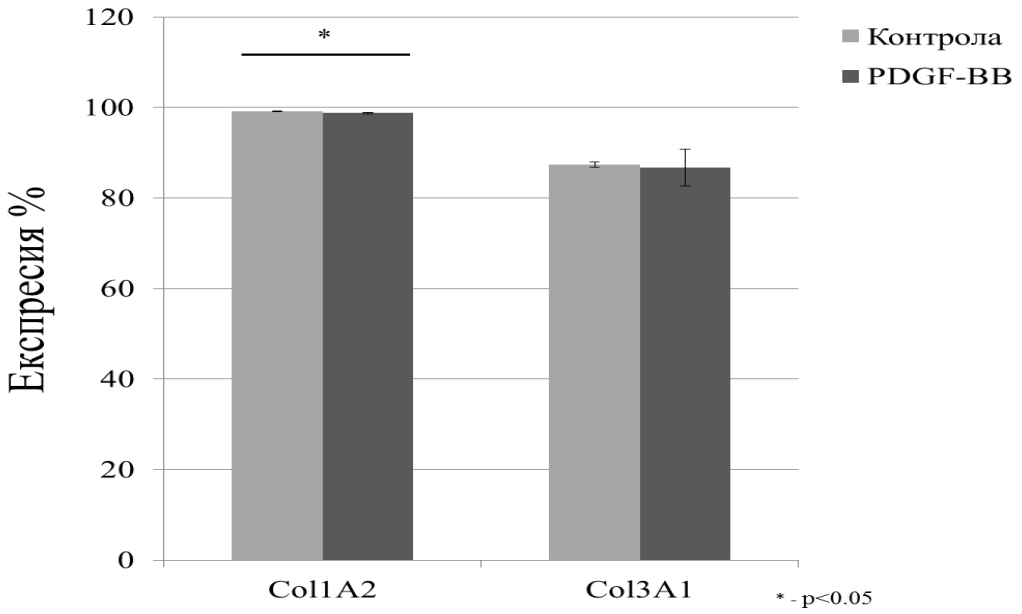
**2.Изследване ефекта на PDGF-BB върху експресията на Col1a2, Col3a1 и SPARC при клетки от ПДЛ.**

Клетки, изолирани от ПДЛ се култивират в безсерумна среда с PDGF-BB в концентрация 50ng/ml и в такава без добавен РФ. Чрез флоуцитометричен анализ се сравнява тяхната способност да експресират маркери, свързани със синтез на колаген. Избраните маркери са Col1a2, Col3a1 и SPARC. Експресията на изброените маркери при клетките, култивирани само в DMEM и ITS, както и тези отглеждани с добавен PDGF-BB се сравнява още с негативна контрола (експресия на маркер CD4). На *Фиг. 17* са показани хистограмите – резултат от флоуцитометричен анализ, които сравняват експресията на маркери спрямо негативна контрола; на *Фиг. 18* и *Фиг. 19* се сравнява експресията между клетки култивирани в автокринна среда и в такава с добавен PDGF-BB. Резултатите от статистическата обработка са дадени в *Таблица 5*.

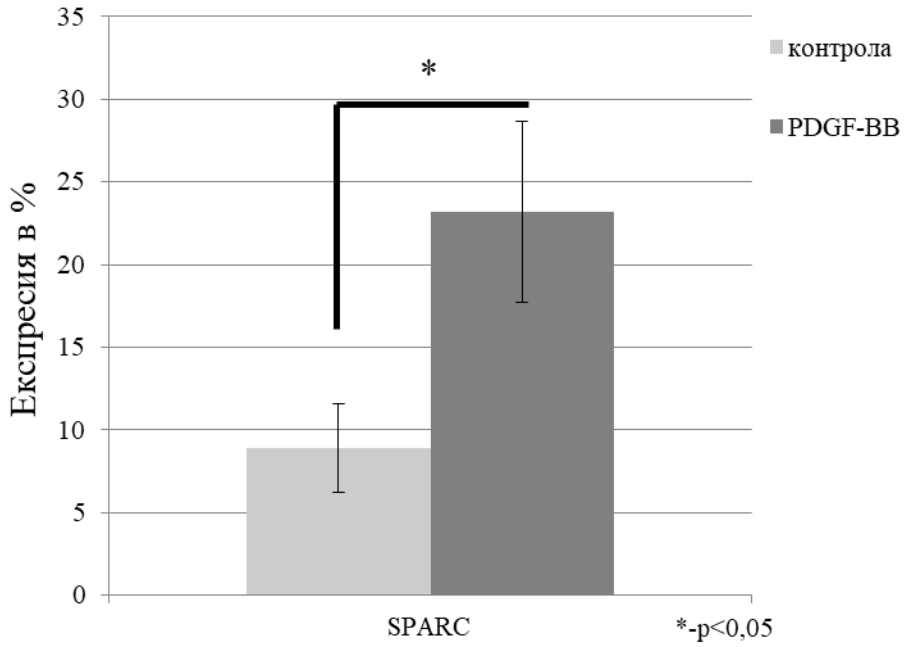



*Фиг. 17 Флоуцитометричен анализ на клетки, изолирани от ПДЛ, демонстриращ ефекта на PDGF-BB върху експресията на колагенови маркери. Експресията на маркерите се съпоставя спрямо негативна контрола от клетки оцветени с антитяло CD4.*

*Експресия*
*Негативна контрола*




*Фиг. 18 Експресия на колагенови маркери при стволови клетки от ПДЛ, култивирани в безсерумна среда с добавен PDGF-BB и при клетки, култивирани без РФ.*




*Фиг. 19 Експресия на SPARC при стволови клетки от ПДЛ, култивирани в безсерумна среда с добавен PDGF-BB и при клетки, култивирани без РФ.*

*Таблица 5 Разпределение на резултатите от статистическия анализ според вида на статистическите показатели и експресията на маркери при МСКПДЛ.*

| Статистически показател / Изследван маркер | Средна стойност (% експресия) | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | |
| Col1A2 | 99,16 | 98,75 | 0,11 | 0,14 | 99,04-99,26 | 98,60-98,88 | <0.05 |
| Col3A1 | 87,40 | 86,71 | 0,54 | 4,01 | 86,78-87,74 | 82,14-89,62 | 0.783 |
| SPARC | 8,89 | 23,19 | 1,69 | 6,65 | 7,68-10,82 | 17,44-30,48 | <0.05 |

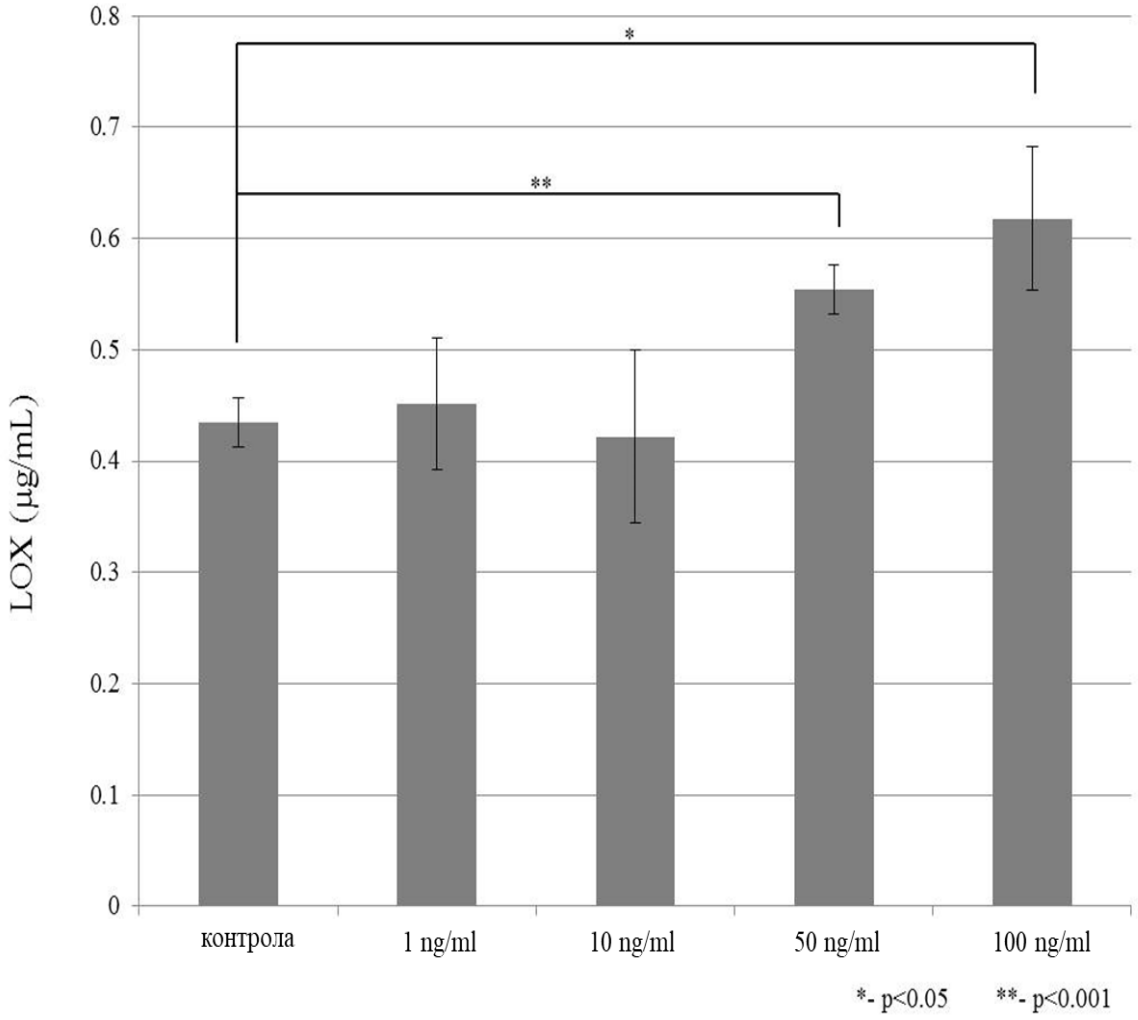
Контрола = експресия на маркерите (Col1A2, Col3A1 и SPARC) при клетки, култивирани в среда без PDGF-BB

**3.Изследване концентрацията на LOX в хранителната среда на клетки от ПДЛ след третирането им с PDGF-BB.**

Изследва се концентрацията/активността на ензима LOX в безсерумна хранителната среда на клетки от ПДЛ след едноседмично култивиране в присъствието на няколко различни концентрации на PDGF-BB. LOX е ензим, който участва в матурацията на колагена в екстрацелуларното пространство (82).

Резултатите от изследването показват, че ниските концентрации на РФ не влияят върху активността на ензима. От друга страна, при третиране на клетките с по-високи концентрации PDGF-BB (50 и 100ng/ml) се

наблюдава статистически значимо увеличение на ензимната активност спрямо контролата и спрямо по-ниските приложени концентрации на РФ (*Фиг. 20*). Резултатите отново показват, че ефектите на РФ основно зависят от концентрацията на активната молекула. Данните от статистическия анализ са представени в *Таблица 6*.




*Фиг. 20 Определяне на активността на ензима LOX в супернатанта на стволови клетки, изолирани от ПДЛ след едноседмично култивиране в среда с добавен PDGF-BB в няколко концентрации. За контрола се използва супернатанта от клетки, отглеждани в среда само с ITS (1%) без добавен РФ.*

*Таблица 6 Разпределение на резултатите от статистическия анализ според вида на статистическите показатели и ефекта на концентрацията на PDGF-BB върху ензимната активност на LOX.*

| Статистически показател / Концентрация на PDGF-BB | Средна стойност (LOX µg/ml) | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | |
| 1ng/ml | 0,435 | 0,451 | 0,022 | 0,059 | 0,413-0,452 | 0,396-0,504 | 0.571 |
| 10ng/ml | 0,435 | 0,422 | 0,022 | 0,078 | 0,413-0,452 | 0,359-0,507 | 0.746 |
| 50ng/ml | 0,435 | 0,554 | 0,022 | 0,022 | 0,413-0,452 | 0,535-0,571 | <0.001 |
| 100ng/ml | 0,435 | 0,618 | 0,022 | 0,064 | 0,413-0,452 | 0,562-0,671 | <0.05 |

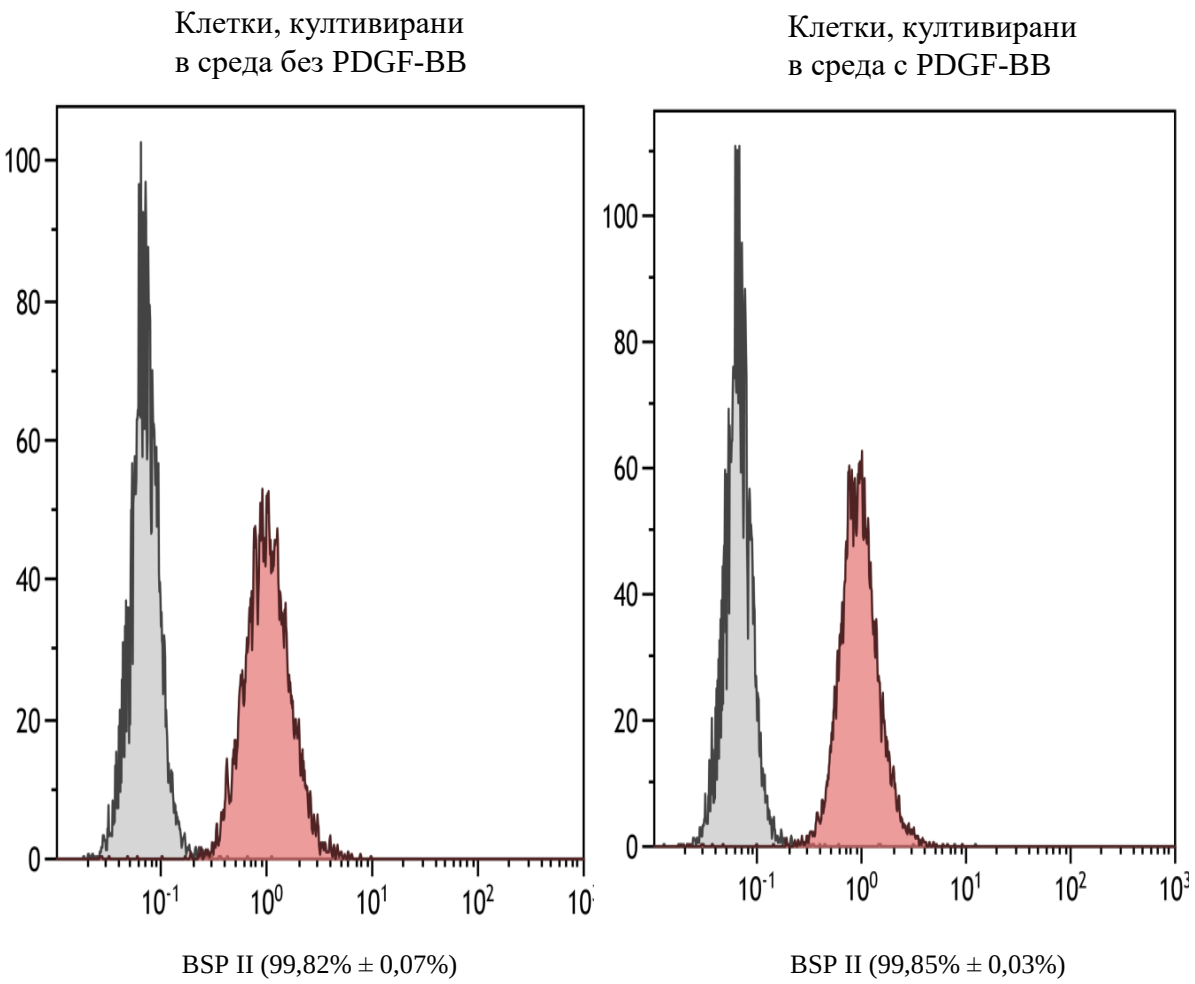
Контрола = клетки, култивирани в среда без добавен PDGF-BB

## V.6.РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 6

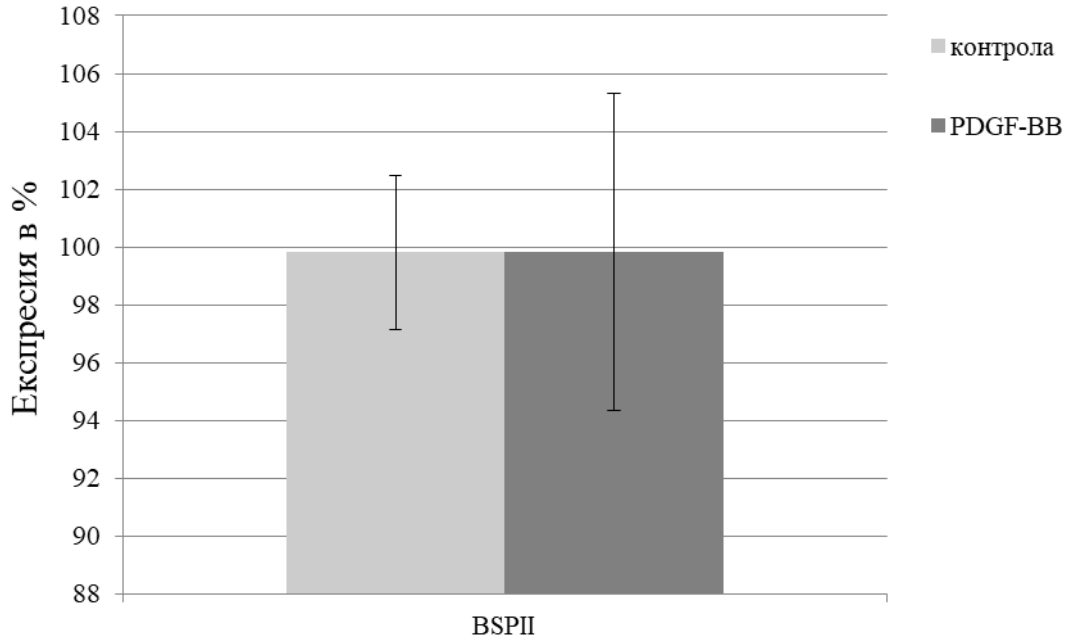
### Влияние на PDGF-BB върху остеогенната диференциация на клетки от ПДЛ

### 1.Изследване ефекта на PDGF-BB върху експресията на минерал – асоцииран маркер: BSP II.

Клетки, изолирани от ПДЛ се култивират в безсерумна среда с PDGF-BB в концентрация 50ng/ml и в такава без добавен РФ. Чрез флоуцитометричен анализ се сравнява тяхната способност да експресират маркери, свързани с процеси на минерализация. Избраният маркер е BSPII. Експресията при клетките, култивирани само в DMEM и ITS, както и тези инкубирани в среда с PDGF-BB се сравняват най-напред поотделно с негативна контрола. Като негативна контрола служи оцветяването на клетките с маркер CD4. На *Фиг. 21* са показани хистограмите – резултат от флоуцитометричен анализ, които сравняват експресията на маркера спрямо негативна контрола; на *Фиг. 22* се сравнява експресията между клетки култивирани в среда с и съответно без добавен PDGF-BB. Резултатите от статистическата обработка са дадени в *Таблица 7*.




*Фиг. 21 Флоуцитометричен анализ на клетки, изолирани от ПДЛ, демонстриращ ефекта на PDGF-BB върху експресията на BSPII. Експресията на маркера при третирани и нетретирани клетки с PDGF-BB е съпоставена спрямо негативна контрола от клетки оцветени с антитяло CD4.*




*Фиг. 22 Експресия на BSPII при клетки от ПДЛ, култивирани в безсерумна среда с добавен PDGF-BB и сравнението им с клетки, култивирани в среда без РФ. Не се установява разлика в експресията между експерименталната и контролната група клетки.*

*Таблица 7 Разпределение на данните от статистическия анализ според вида на статистическите показатели и експресията на маркер BSPII при МСКПДЛ.*

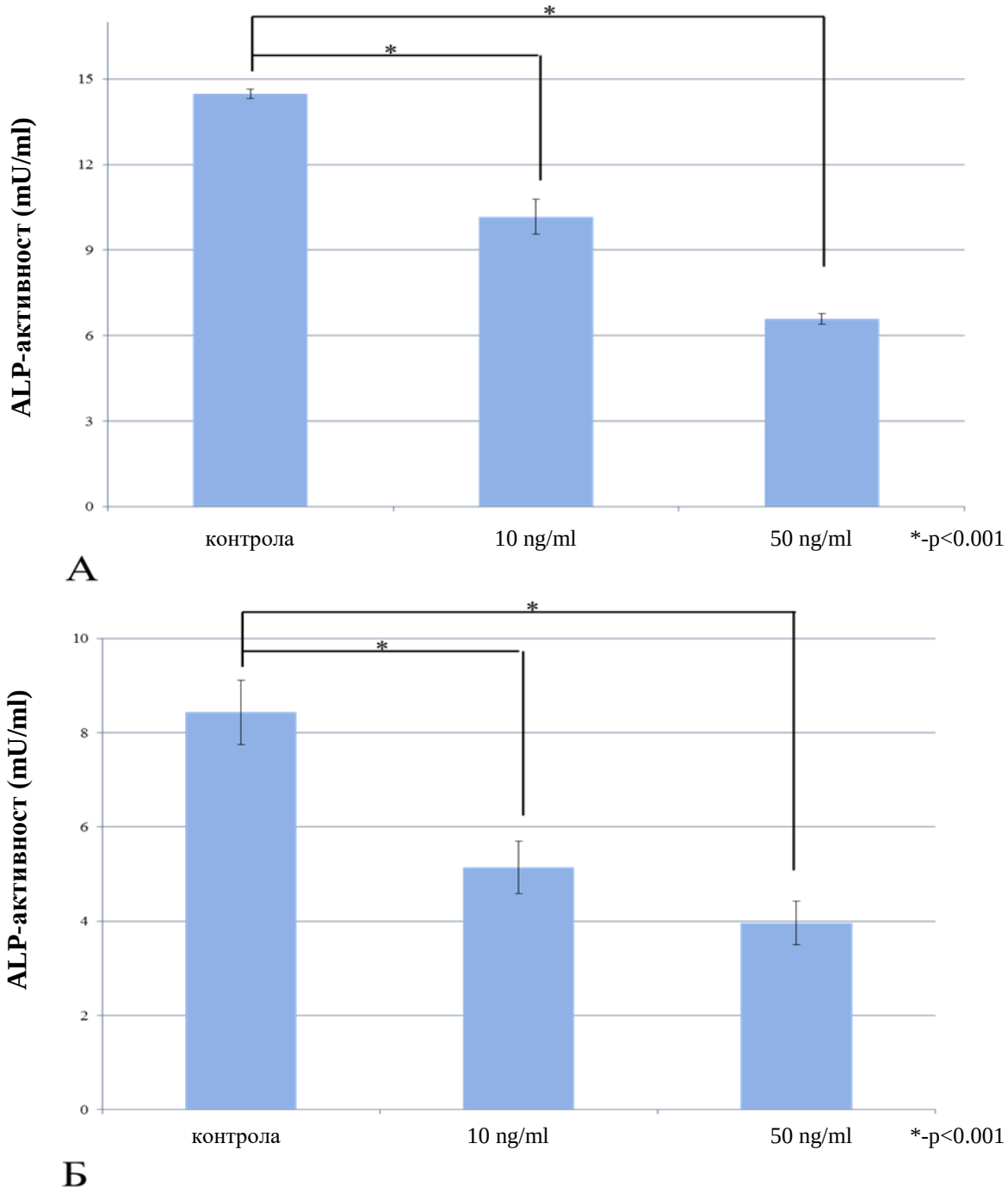
| Статистически показател / Изследван маркер | Средна стойност (% експресия) | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | |
| BSPII | 99,82 | 99,85 | 0,07 | 0,03 | 99,74-99,86 | 99,82-99,88 | 0.488 |

Контрола = експресия на BSPII при клетки, култивирани в среда без PDGF-BB

## 2.Изследване на ALP-активност на клетъчни култури от ПДЛ.

Посредством функционален тест се установява ALP-активност на стволови клетки от ПДЛ, след едноседмично третиране на културите с PDGF-BB в две различни концентрации (10ng/ml и 50ng/ml). На *Фиг. 23А,Б* е показано влиянието на РФ върху активността на този ензим в изследваните клетки. Изследва се количеството ензим в супернатантата и в клетъчния слой – едновременно за двата компонента и независимо един от друг. След това се изчислява ALP-активност по формула, предложена от производителя на приложения в изследването кит. Данните от статистическия анализ са представени в *Таблица 8 и Таблица 9*.

Резултатите показват, че PDGF-BB проявява супресорен ефект върху активността на ензима при МСКПДЛ, респ. върху процесите на ранна минерализация в изследваните стволовоклетъчниклетъчни култури




*Фиг. 23 Отчитане на ALP-активност на МСКПДЛ след едноседмично третиране с различни концентрации PDGF-BB. А - ALP-активност в супернатанта, Б – ALP-активност в клетъчния слой.*

*Таблица 8 Разпределение на данните от статистическия анализ според вида на статистическите показатели и ефекта на концентрацията на PDGF-BB върху ALP-активност в супернатанта.*

| Статистически показател / Концентрация на PDGF-BB | Средна стойност (ALP-активност-mU/ml, в супернатанта) | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | |
| 10ng/ml | 14,48 | 10,17 | 0,17 | 0,62 | 14,37-14,58 | 9,77-10,56 | <0.001 |
| 50ng/ml | 14,48 | 6,59 | 0,17 | 0,18 | 14,37-14,58 | 6,47-6,70 | <0.001 |

Контрола = клетки, култивирани в среда без PDGF-BB

*Таблица 9 Разпределение на данните от статистическия анализ според вида на статистическите показатели и ефекта на концентрацията на PDGF-BB върху ALP-активност в клетъчния слой.*

| Статистически показател / Концентрация на PDGF-BB | Средна стойност (ALP-активност-mU/ml, в клетъчна суспензия) | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | |
| 10ng/ml | 8,43 | 5,14 | 0,68 | 0,56 | 8,00-8,86 | 4,79-5,50 | <0.001 |
| 50ng/ml | 8,43 | 3,96 | 0,68 | 0,46 | 8,00-8,86 | 3,67-4,52 | <0.001 |

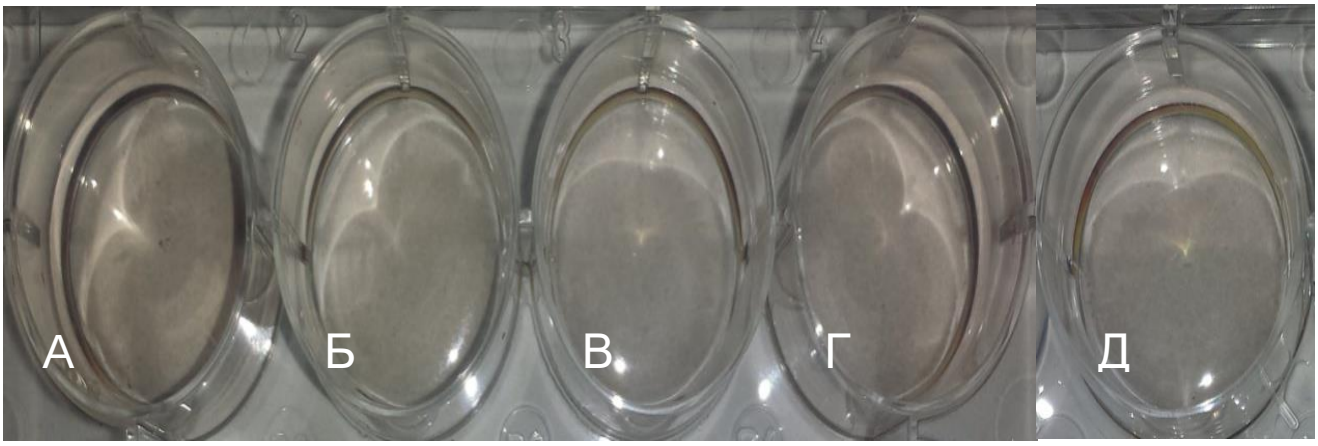
Контрола = клетки, култивирани в среда без PDGF-BB

## 3.Ефект на PDGF-BB върху образуването на калциеви нодули при клетъчни култури от ПДЛ.

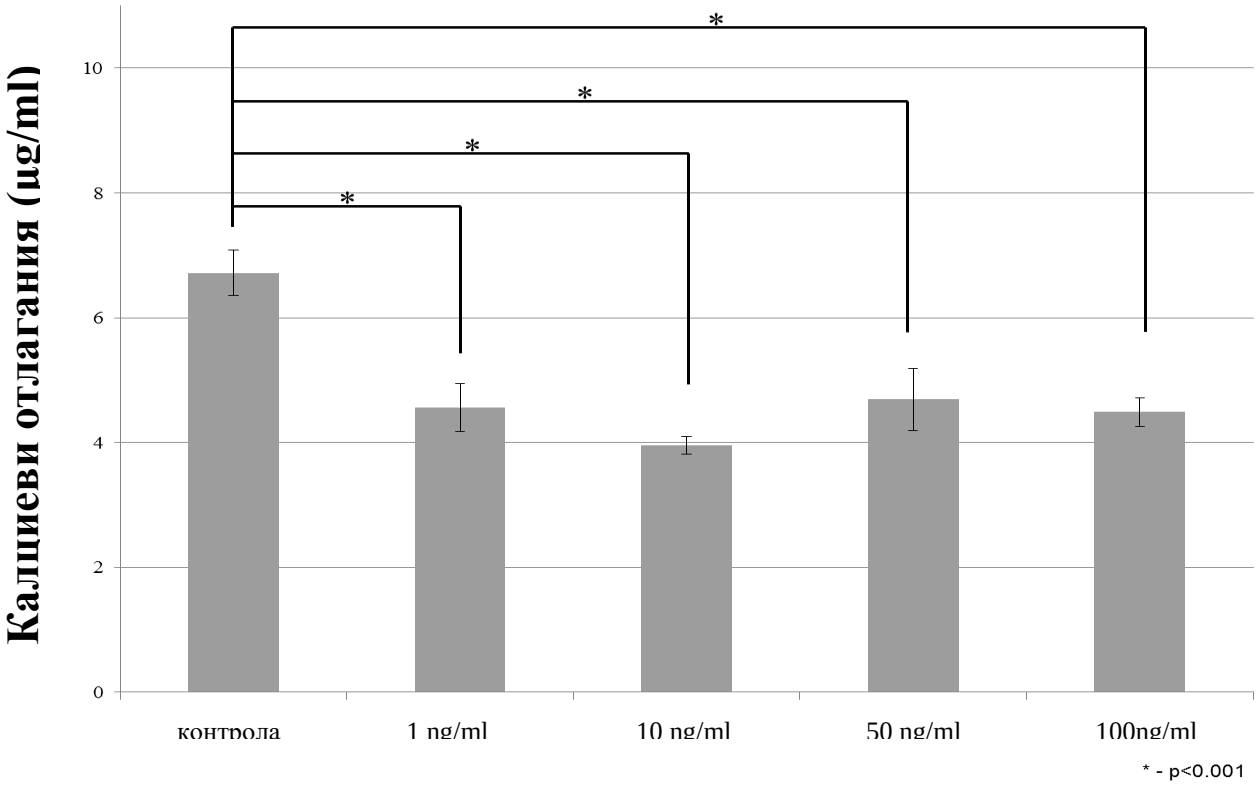
Една от характерните особености на МСК е способността им да се диференцират до остеобластоподобни клетки в подходящи условия. В настоящия научен труд се изследва влиянието на РФ PDGF-BB върху минерализацията на клетки от ПДЛ.

Остеогенната диференциация се определя с багрилото Alizarin red за оцветяване на калциеви натрупвания в керемиденочервен цвят след триседмично култивиране на МСКПДЛ. Това време е необходимо за образуване на достатъчно калциеви отлагания, които да бъдат визуализирани чрез теста. Данните от качествената и количествената оценка от експеримента са представени на *Фиг. 24* и *Фиг. 25*, а статистическия анализ на резултатите е представен в *Таблица 10*.

Качествената оценка на пробите, а именно инспектирането на плаките с просто око след оцветяване с Alizarin red показва пълна липса на минерализация при МСКПДЛ, култивирани с PRDGF-BB (*Фиг. 25*). Тъй като този метод е субективен, отчитането се прави и чрез количествен анализ. Установява се, че PDGF-BB значително потиска минерализационните процеси в МСКПДЛ. Тази тенденция се наблюдава при всички използвани концентрации без статистически значими разлики между тях (*Фиг. 26*). Следователно PDGF-BB, дори в ниски дози, проявява силен супресорен ефект върху остеогенните процеси в МСКПДЛ.




*Фиг. 24 Оцветяване на култури от МСКПДЛ с Alizarin red за установяване наличие на калциеви нодули, след триседмично инкубиране. Клетките са култивирани в условия с различни концентрации на РФ PDGF-BB: А – 0ng/ml (без РФ); Б – 1ng/ml; В – 10ng/ml; Г – 50ng/ml; Д – 100ng/ml.*




*Фиг. 25 Количествен израз на способността на СКПДЛ, култивирани в условия с различни концентрации на РФ, да образуват калциеви отлагания. Количеството багрило (Alizarin red) е изразено в µg/ml.*

*Таблица 10 Разпределение на резултатите от статистическия анализ според вида на статистическите показатели и ефекта на концентрацията на PDGF-BB върху формирането на минерални нодули в популация на МСКПДЛ.*

| Статистически показател / Концентрация на PDGF-BB | Средна стойност (калциеви отлагания-µg/ml) | | Стандартно отклонение | | 95% доверителен интервал | | P-стойност |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | Контрола | Клетки, третирани с PDGF-BB | |
| 1ng/ml | 6,72 | 4,56 | 0,36 | 0,38 | 6,39-7,01 | 4,23-4,82 | <0.001 |
| 10ng/ml | 6,72 | 3,95 | 0,36 | 0,14 | 6,39-7,01 | 3,84-4,07 | <0.001 |
| 50ng/ml | 6,72 | 4,69 | 0,36 | 0,50 | 6,39-7,01 | 4,26-5,08 | <0.001 |
| 100ng/ml | 6,72 | 4,49 | 0,36 | 0,23 | 6,39-7,01 | 4,29-4,69 | <0.05 |

Контрола = клетки, култивирани в среда без PDGF-BB

# VI.ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

## ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПО ЗАДАЧА 1

**Констатации** въз основа на резултатите:

1.В ПДЛ на постоянни зъби се установява наличие на популации от МСК

2.МСКПДЛ могат да бъдат изолирани успешно от екстрахирани интактни зъби и да се култивират в подходящи *in vitro* условия

3.Първите мигрирали и адхезирали единични МСК по дъното на културелните съдове се забелязват средно 1 до 3 дни след засяването на тъканните лизати

4. Първите колонии от периодонтални МСК в *in vitro* условия се оформят в рамките на 7-10 дни

5.Изолираните МСКПДЛ имат типична фибробластоподобна морфология с характерна вретеновидна или звездовидна форма

Стволовите клетки са недиференцирани и имат свойство да се самообновяват, могат да се делят неограничено и да заместват увредени клетки от същата линия (33,44,83,157). Типично свойство на стволовите клетки е, че могат да се диференцират до различни високо специализирани клетъчни типове *in vitro* (33,43,137). Това определя тяхната т. нар. мултилинеарност. Друга характерна особеност на МСК е способността им да инхибират пролиферацията на Т-клетките и да потискат имунните реакции (11,66,161). Всички тези характериситки на стволовите клетки водят до идеята за развитие на стволовоклетъчната терапия и бъдещото им прилагане в клиниката за лечение на редица патологични състояния: автоимунни системни заболявания на съединителната тъкан,

дегенеративни заболявания, възстановяване на екстензивни деформитети след хирургично лечение на тумори, стимулиране остеоинтеграцията на дентални имплантати, пародонтални костни лезии, реплантиране на експулсирани зъби и т.н. (7,33,48,199).

Едни от най-широко изследваните МСК са изолираните от костен мозък (106,144,158). Тези клетки често служат като контролна група за съпоставяне на морфология и функция на новооткрити МСК от други органи. Изолирането на костномозъчни МСК има своите негативни страни. Това са дискомфортът и болката на мястото на донорната ложа, от която се изолират клетките, както и необходимостта от провеждането на допълнителна хирургична интервенция за взимането на материала. Тези недостатъци подтикват към търсенето на алтернативни, по-лесно достъпни източници на МСК в организма. Такива са зъбните структури. От тях се изолират МСК чрез по-малко инвазивни интервенции. До сега са описани СКЗППЗ, СКЗПВЗ, СКПДЛ, СКАЗП и ПКДФ (102,132).

МСК от ПДЛ се получават най-често от интактни премолари и трети молари след рутинна екстракция (140,228,243,248).

В настоящия научен труд се постига успешно изолиране на МСК от човешки ПДЛ. Съществен критерии при подбора на биологичния материал е зъбите, от които ще бъде изолиран да бъдат напълно интактни, без наличие на патологични изменения. При екстракция на зъбите се спазват стриктно всички правила на антисептиката и асептиката. По този начин се свежда до минимум рискът от развитие на инфекции и опорочаване на експерименталната работа. Екстрахираните зъби се съхраняват в стерилна хранителна среда и се транспортират до лабораторията за клетъчно култивиране максимално бързо. ПДЛ се отделя от зъба, подлага се на ензимна обработка и засяване при стандартните условия за култивиране на МСК. Част от клетките се използват за експериментали цели непосредствено след изолирането им, а други се замразяват в течен азот.

Нашият опит до момента сочи, че съхраняването на МСК в течен азот не понижава регенеративния им потенциал и стволовоклетъчните им свойства. Провеждали сме пробни експерименти с клетки, съхранявани в течен азот за период от 3год. и не сме установили дефицит във функциите им. Въпреки това, във всички опитни постановки, проведени за целите на настоящото проучване са използвани само МСКПДЛ, които не са били замразявани.

Един до 3 дни след засяване на тъканните лизати установихме наличие на първите адхезирали клетки по дъното на културелни съдове. Те имат малки размери и формата им е вретеновидна или звездовидна, т.е. те притежават типична морфология на фибробластоподобни клетки. Същата морфологична находка е описана и от Seo и съавт. (248), които първи разкриват наличието на МСК в ПДЛ. Морфологията на периодонталните стволови клетки е описана в последствие и от много други автори (12,69,228,254,259,284).

Методите за изолиране на МСКПДЛ са добре известни и се прилагат от всички учени, ангажирани в тази област (108,122,162,228,243,259,284,320). В настоящото проучване се прилагат утвърдените вече методики. Клетките се култивират в хранителна среда с включен ФТС и се съхраняват в инкубатор при температура 37$^{o}$C. Хранителната среда с ФТС и антибиотик се сменя всеки ден, за да се поддържат постоянно стерилни условия на култивиране и високи нива на биологично активни вещества, необходими за клетъчните процеси. Установихме, че при тези условия клетките се делят с оптимална скорост – средно 1-1,5 пъти за 24ч. Съдовете за клетъчно култивирани се наблюдават неколкократно, ежедневно със светлинен микроскоп. Морфологията и темпът на размножаване на клетките са строго контролирани. Активната клетъчна пролиферация осигурява бързото получаване на достатъчен брой клетки за реализиране на всички планирани експерименти в настоящия

научен труд. Неправилно е да се счита, че зъбните тъкани са източник на ограничено количество МСК. Резултатите от експериментите, които се провеждат в настоящото проучване сочат, че броят на тези клетки може да се увеличи многократно за сравнително кратко време при подходящи условия *in vitro*.

През първите дни след засяването на тъканните експлантати, по дъното на културелните съдове наблюдаваме само единични адхезирали клетки. Групи от клетки, формиращи колонии се забелязват средно след 7-10 дни. Резултатите от проведените от нас експерименти ясно показват една основните характеристики на МСКПДЛ, а именно потенциала им да формират колонии при *in vitro* клетъчно култивиране. Данни, намерени в литературата, също показват, че първите единични колонии в клетъчна култура от ПДЛ се образуват за период от 7-10-14 дни (228,248).

С нарастване на конфлуентността на клетъчния монослой, микроскопски установяваме слаба промяна в клетъчната форма. Клетките придобиват по тясна и удължена форма. След достигане на необходимата конфлуентност, клетките се пасажират и намножават в нови културелни съдове.

По време на преките ни наблюдения върху поведението на МСКПДЛ *in vitro* направи впечатление, че клетъчната пролиферация е най-висока между първата и втората седмица от засяване на клетките. След формирането на плътен конфлуентен слой по дъното на културелните съдове, клетъчната пролиферация се забавя.

Много бързо след като се доказва, че в тъканите съществува резерв от МСК се популяризира идеята за бъдещото им приложение в клиничната практика (7,33,46,199). Потенциалът на МСК от ПДЛ да стимулират пародонталната тъканна регенерация се потвърждава основно от експерименти, проведени върху животни (126,148,317). Тези изследвания доказват, че клетки от ПДЛ могат да се изолират и култивират в

подходящи условия *in vitro* с последващо *in vivo* реплантиране около пародонтални дефекти. Стволовите клетки притежават някои характеристики, които трябва да бъдат взети под внимание и проучени преди това. От основно значение е теоретично неограниченият потенциал на МСК да се делят (48). Това може да доведе до неконтролируема пролиферация на мястото, в което са аплицирани клетките. Известно е, че неконтролируемото клетъчно делене е типичен белег на туморните процеси (6,9,67,105). Изисква се подробен анализ на свойствата и предварителна *in vitro* подготовка на МСК, когато са предназначени за терапевтични цели. Риск от неопластични процеси съществува най-вече при използването на ЕСК и ИПСК (48,163). Не бяха намерени данни в литературните източници, които да доказват, че ССК и най-вече тези от зъбен произход могат да инициират спонтанна туморогенеза. Това дава основание да се твърди, че тези клетки могат да се прилагат безопасно в клиниката.

Основавайки се на резултатите от проведените от нас експерименти до момента, можем да предположим, че непосредствено след имплантиране на МСКПДЛ *in vivo* във витални тъкани те ще имат една фаза на интензивна пролиферация. Активно делящите се МСК ще доведат до бърза клетъчна репопулация в реципиентната зона. Стволовите клетки биха компенсирали локалния клетъчен и тъканен дефицит, които обикновено се наблюдават при повечето патологични процеси в периодонциума. Функциите на МСК до голяма степен ще бъдат дефинирани от условията на микросредата. Всички активни молекули в средата (РФ, цитокини, хемокини, IL, витамини и др.) биха повлияли в различна степен и по различен механизъм функцията на МСК.

## ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПО ЗАДАЧА 2

**Констатации** въз основа на резултатите:

1.Потвърдихме, че изолираните от нас периодонтални клетки екпресират STRO-1, CD44, CD105, CD146. Това са стволовоклетъчни маркери, които по литературни данни се експресират от МСК

2.Периодонталните МСК успешно експресират и други стволовоклетъчните маркери CD49f, CD117, CD271. До момента не сме открили данни в литературата, които да доказват експресията на тези три маркера в периодонтални МСК

3. МСКПДЛ могат да експресират диференциационни маркери (колагенови и минерализационни). Това свойство се асоциира със способността им да се диференцират до различни типове клетки според условията на средата

При изолиране и предстояща експериментална работа с МСКПДЛ е необходимо тяхното предварително характеризиране на базата на експресия на маркери (228,248,296). Характеризирането се прави в *in vitro* условия с цел да се докаже, че изолираните клетки действително са стволови (228,248,296). Въпреки големия брой повърхностни стволовоклетъчни маркери описани в литературата, все още няма открит универсален маркер, който доказано да се експресира от всички МСК (183,217). Експресията на маркерите е различна при клетки с разнороден тъканен произход. Често процентът, в който даден маркер се експресира при клетки от една и съща тъкан може да варира при отделните индивиди – донори на биологичен материал (137). Възрастта на пациента и поредния номер на клетъчния пасаж също имат значение за експресията на маркери (137).

В проведеното от нас изследване са включени няколко стволовоклетъчни маркера маркера, с които се потвърждават свойствата на изолираните периодонтални стволови клетки. За част от маркери е доказано, че се експресират при този тип зъбни МСК (STRO-1, CD44, CD105, CD146) (296,320). Наред с тези маркери, в настоящото проучване се изследва и експресията на CD49f, CD117, CD271. Последните също доказват стволовоклетъчен фенотип, но експресията им върху периодонтални МСК не е изследвана до момента.

Селектираните маркери имат следните характеристики:

- CD44/HCAM – трансмембранен гликопротеин, рецептор за хиалуронова киселина (166); рутинно използван за специфично маркиране на МСК. Освен с хиалуронова киселина, CD44 може да свързва и други лиганди като остеопонтин, колаген, матриксни металопротеинази (ММП). Участва в множество клетъчни функции като лимфоцитна активация, хематопоеза, развитие на туморни метастази (166). Свързва се с прогресията на плоскоклетъчния карцином в областта на главата и шията (297).

- CD105/ендоглин – тип 1 мембранен гликопротеинов рецептор, намиращ се върху клетъчната повърхност; част от TGF-бета рецепторния комплекс (175). Влияе върху туморния растеж; участва в ангиогенезата (101); маркер за МСК (135).

- CD117 – нарича се още Stem cell growth factor receptor (SCFR) – рецептор за стволовоклетъчен растежен фактор, протоонкоген c-Kit; той е тирозин киназен протеинов рецептор (18). Използва се за идентифицирането на стволови клетки от зъбна пулпа

хематопоетични стволови клетки, тимоцитни прогениторни клетки, мастни клетки, меланоцити в кожата и др. (137,139).

- CD146/MCAM (melanoma cell adhesion molecule) – рецептор за ламинин алфа-4 – матриксна молекула, която се експресира в съдовата стена; експресира се в съдовите ендотелиални клетки, гладкомускулните клетки и перицитите; маркер за МСК изолирани от различни тъкани в организма; свързва се клетъчна мултипотентност и висок диференциационен потенциал (82,241).

- STRO-1 – един от най-добре познатите маркери за доказване наличието на МСК в тъканите и най-вече тези от зъбен произход; редица изследвания го прилагат за потвърждаване наличието на МСК в тъканни експлантати (217,248).

- CD49f/ алфа-6-интегрин – регулатор на сигналните пътища за голям брой клетъчни процеси; участва в изграждането на трите зародишеви пласта; маркер за плурипотентни и ЕСК (313).

- CD271 – рецептор за невротрофини; стимулира невроналните клетки да се делят и диференцират; има високи нива на експресия при костномозъчни, мастни МСК (144), МСК от зъбен произход, включителни и тези от ПДЛ (222).

Изводите, до които се стига след подробен анализ на литературните източници показват, че двата най-често използвани маркера при човешки МСК от ПДЛ са CD146 и STRO-1 (259,293). Zhu и кол. (320), дори използват CD146 като маркер, с който сепарират клетките на CD146-позитивни и CD146-негативни, след което съпоставят свойствата им. Друг

често използва маркер при МСКПДЛ е CD105 (254). В настоящото проучване също се установява тяхната експресия при изследваните клетъчни култури. Chen и кол. (69) доказват наличие на периодонтални МСК чрез качествен имунохистохимичен метод, използвайки маркерите CD44, CD146 и STRO-1. И трите маркера се експресират положително. В друго проучване, характеризирането на МСКПДЛ става на базата на три маркера едновременно – CD90, CD105 и CD146 (259).

Част от стволовоклетъчните маркери, включени в настоящото изследване са добре познати маркери за доказване стволовоклетъчните свойства на клетки от ПДЛ. Наред с тях се използват и стволови маркери, чиято експресия в изследвания вид клетки не е доказана още. Методите, които се използват за потвърждаване стволовоклетъчния характер на клетките в изследването са имунофлуоресценция и флоуцитометрия. Имунофлуоресценцията е качествен метод, а флоуцитометрията – количествен. Двата метода се допълват взаимно и осигуряват висока степен на достоверност на получените резултати.

Анализът на експресията на стволовоклетъчни маркери показва, че в изолираната клетъчна култура от ПДЛ има наличие на МСК. Откриваме известни разлики в процента на маркерна експресия при изследваните от нас клетки и резултатите в литературата (69,140,254). Тези отклонения са нормални и напълно предсказуеми. Базират се на разлика в използваните методики при клетъчна характеризация, както и на индивидуални разлики между донорите на биологичен материал. Друга много важна причина, която с висока вероятност оказва влияние върху експресията на маркери при изследваните клетки е, че в проведените от нас експерименти, ФТС в хранителната среда е заменен с ITS.

Клетките в настоящото проучване са култивирани в селективни условия, оптимални за развитието на МСК. Въпреки това, освен стволови клетки, ПДЛ съдържа редица други клетъчни типове като фибробласти,

ендотелиални клетки, остеобласти, циментобласти, имунни клетки, епителни остатъци на Malassez, сетивни клетки, изпълняващи различни функции (41,210). Клетъчната култура, която изследваме е хетерогенна и клетките притежават различен диференциационен потенциал. Очакваме наред с експресията на стволовоклетъчни маркери, да открием и позитивна експресия на маркери, асоциирани със синтез на колаген и минерализация. Позитивната експресия на последните от МСКПДЛ доказва, че те имат способност да се диференцират до високо специализирани клетъчни типове (колагенсинтезиращи, остеобластоподобни и др.), т.е. потвърждава потенциалът им за мултилинеарна диференциация.

В проучването се изследва експресията на следните диференциационни маркери:

- ALP – хидролизиращ ензим, който при алкално pH отстранява фосфатни групи от различни молекули, включително нуклеотиди, протеини, алкалоиди; процесът се нарича дефосфорилация; ALP се среща в литературата още под наименованието основна/базична фосфатаза; ензимът се асоциира с недиференцирани СК, остеогенни и одонтогенни прекурсори (248,275,314).

- COL1a2 – основна съставна част на ЕЦМ в съединителната тъкан; част от органичната съставка на дентина и пулпата, както и на други органи като кости, корнея, сухожилия; синтезира се от повечето мезенхимни клетки (225,309).

- COL3a1 – експресира се още по време на ембриогенезата; при възрастни е съставна част на ЕЦМ на много органи, включително и тъканите, изграждащи зъба и зъбодържащия апарат (309).

Фибриларните типове колаген са основен компонент в ЕЦМ на ПДЛ, като тип I и тип III са в най-висок процент (~75% и 20% респективно) (310). Колагеновите фибри осигуряват механична стабилност на съединителнотъканните структури като сухожилия, кръвоносни съдове, ПДЛ и т.н. (54,166)

- SPARC – гликопротеин в костите, който се свързва с калциеви йони; секретира се от остеобластите по време на процеса на костообразуване и инициира минерализацята на тъканта; експресира се също в меки тъкани, включително и в гингива, и стабилизира интегритета на ЕЦМ; увеличената му експресия се асоциира с някои туморни заболявания (121). SPARC е сред най-добре представените неколагенови протеини в ЕЦМ, отговорни за баланса между резорбция и образуване на кост (188). Представлява колаген-свързващ гликопротеин, участващ в инициацията на колагеновата фибрилогенеза в ЕЦМ (188).

Чрез имунофлуоресценция доказваме положителна експресия на четирите описани диференциационни маркери в периодонтални стволови клетки: двата най-разпространени типове колаген (тип I и III), SPARC и ALP. Положителната експресия на колагенови маркери в проведените от нас експерименти потвърждава резултати, докладвани от други автори (248). Според последните МСКПДЛ експресират колагенови маркери и формират колагенови фибри, силно наподобяващи Шарпееви влакна. Следователно, периодонталните стволови клетки участват активно в периодонталната регенерация. Същите автори докладват, че периодонталните МСК са способни и да инициират изграждането на комплекси подобни на цимент-ПДЛ, след имплантирането им в опитни

животни. Експресията на колагенови маркери и способността на МСКПДЛ да изграждат колагенови фибри зависи основно от условия на култивиране на клетките.

До момента няма изследвания в литературата, които доказват експресията на SPARC в МСКПДЛ. Предвид значението му както за процеси на минерализация, така и за колагенова фибрилогенеза, SPARC е интересен маркер за научни изследвания. Имунофлуоресценцията потвърждава неговата експресия в изолираните от нас периодонтални МСК.

ALP е неколагенов протеин в ЕЦМ, отговорен за костния метаболизъм. ALP се използва като ранен маркер за остеогенна диференциация в клетъчни култури (147). Доказано е, че МСКПДЛ могат да експресират ALP (248). В настоящото проучване се потвърждава позитивната експресия на минерализационния маркер в изследваната популация.

Положителната експресия на описаните маркери потвърждава потенциала на клетките за мултилинеарна диференциация и реализиране на процеси на синтез на ЕЦМ и минерализация. Тези функции на МСК са свързани със способността им да поддържат интегритета на ПДЛ и да участват в тъканната регенерация при наличие на патологичен процес. Диференциацията на изолирани МСК изисква специални *in vitro* условия. Остеогенната диференциация се реализира, когато в средата бъдат включени дексаметазон и бета-глицеро фосфат (12,69,228,248,254). За иницииране на адипогенна и хондрогенна диференциация се изисква наличие на дексаметазон, инсулин, метилксантин/бета-меркаптоетанол или TGF-beta, дексаметазон, аскорбинова киселина, натриев пируват и пролин, респективно (228,248,254,296). Включването на тези активни вещества в средата насочват клетъчната диференциация към определен високо специализиран клетъчен тип.

Резултатите от имунофлуоресценцията показват, че в изолираната от нас клетъчна култура присъстват клетки, които експресират както стволовоклетъчни така и диференциационни маркери – за колаген и минерализация. Успешно доказахме стволовоклетъчния фенотип на МСКПДЛ и потенциала им за мултилинеарна диференциация. Тези клетки могат да променят фенотипа си според *in vitro* условията. Важна роля играят активните вещества в средата – РФ, цитокини, витамини и др., които отключват различни клетъчни процеси и влияят върху клетъчната сигнализация.

## ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПО ЗАДАЧА 3

**Констатации** въз основа на резултатите:

1.PDGF-BB влияе върху клетъчния цикъл на МСКПДЛ, увеличавайки броя клетки в активна фаза на пролиферация (G2/M-фаза)

2.PDGF-BB стимулира клетъчната пролиферация на периодонтални стволови клетки. Ефектите от активността му са дозозависими и са оптимални при концентрация от 50ng/ml

PDGF е най-добре представеният РФ в тромбоцитите, респ. в ТК. (97,270). Притежава няколко изомерни форми, различаващи се по степен на активност (14,112,123). Предишни проучвания сочат, че PDGF-BB изомерът има по-добър ефект върху процесите на пролиферация и миграция при клетки от ПДЛ в сравнение с другите изомерни форми на PDGF (50). За провеждането на експериментите в настоящото проучване се избира именно -BB изомерът. Докладвано е, че PDGF-BB има позитивен ефект върху клетъчната адхезия (314), химиотаксиса, пролиферацията и матриксния синтез (50,220) на клетки от ПДЛ. Клетъчната пролиферация е

един от най-важните процеси за оптималното протичане на тъканна регенерация. Увеличаването на клетъчния брой на мястото на тъканно увреждане води до бърза репопулация в областта на засегнатия участък (18,42,43,307).

В настоящото проучване се установява ефектът на PDGF-BB върху разпределението на клетките в културата по фазите на клетъчния цикъл. С най-важно значение е процентът клетки в G2/M фаза. Това са активно делящите се клетки към момента на фиксирането им, след изтичане на необходимото време за третиране с РФ.

Двадесет и четири часа след засяването на клетките, хранителната среда, съдържаща 10% серум се заменя с такава, в която има само 0,1% ФТС за още едно денонощие. Тази стъпка е необходима, за да се постигне синхронизиране на клетъчния цикъл на всички клетки в културата. Клетките преминават в една и съща фаза на клетъчния цикъл, тъй като в среда с минимално процентно съдържание на ФТС жизненият им цикъл се забавя. По-късно се добавят четири различни типа хранителна среда: DMEM с 0,1% ФТС, DMEM с 10% ФТС, DMEM с 0,1% ФТС и 50ng/ml PDGF-BB, DMEM с 10% ФТС и 50ng/ml PDGF-BB. Клетките се инкубират при тези условия за период от 48 ч. По данни, които се откриват в литературата, 48 ч. е необходимото време за удвояване на клетъчната популация от ПДЛ (284). През този период се очаква клетката да премине през всичките фази на клетъчния цикъл. В края, броят на клетките в популацията нараства приблизително двукратно.

За този експеримент е избрана само една концентрация на PDGF-BB. Целта е да се установи най-напред дали РФ влияе върху пролиферацията и по какъв начин (стимулира я или я инхибира). Съответно на очакванията ни процентът клетки в G2/M фаза е забележително по-голям след третиране с DMEM и 10% ФТС (30.82%) в сравнение с процентът клетки в същата фаза след култивиране в среда с минимално количество серум

(6,6%). Клетките, към чиято среда е прибавен и PDGF-BB в концентрация 50ng/ml пролиферират значително по-активно, особено в условия, при които РФ е в комбинация с 10% серум (40,5% клетки в G2/M-фаза). Данни от предишни изследвания показват, че PDGF увеличава броя клетки в G2/M-фаза на клетъчния цикъл и при фибробласти (14).

За оптимално протичане на клетъчна пролиферация и диференциация са необходими *in vitro* условия, максимално наподобяващи тези в живия организъм. Клетките се култивират *in vitro* обикновено в среда с добавен серум. В него се съдържат хормони, протеини, аминокиселини, РФ и цитокини (137). При включване на ФТС в средата не успяваме на установим точното количество на активните молекули в него. Следователно, ако се изследва ефект на РФ върху клетъчни култури в среда с добавен ФТС, получените резултати няма да бъдат „чисти“. Всички активни молекули включени в серума ще окажат влияние върху клетъчните процеси. Това прави невъзможно доказването на индивидуалната активност на изследвания от нас РФ.

Друг недостатък на клетъчно култивиране в среда с ФТС е, че той представлява продукт от животински произход. Използването на културелна среда с ксеногенен ФТС в стволовоклетъчната терапия води до риск от имунна реакция (158). Алтернативен вариант е прилагането на автоложен серум. Проблем при използването на автоложен серум е ограниченото количество кръв, която може да се вземе от пациента за получаването му. Работата с автоложен серум допълнително усложнява протокола на работа и увеличава стойността на стволовоклетъчната терапия.

След като се взимат под внимание недостатъците на ФТС преценяваме, че за установяване активността на PDGF-BB е необходимо да използваме безсерумна хранителна среда. На базата на информация от литературни източници избираме ITS като заместител на ФТС (137). По-

голяма част от екпериментите в настоящото проучване се провеждат в безсерумна хранителна среда с добавен 1% ITS. Очаква се, че активността на PDGF-BB варира в зависимост от концентрацията. Изследваме ефекта на PDGF-BB, добавен към хранителна среда с 1% ITS върху клетъчния брой (пролиферацията) на стволовоклетъчна култура от ПДЛ. Избраните концентрации на РФ са 1ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml и 100ng/ml. Така доказваме едновременно митогенния ефект и значението на концентрацията на РФ.

Резултатите ни показват първо: че PDGF-BB е активен митоген за периодонтални МСК и второ: че всички изследвани концентрации на РФ стимулират значимо увеличаването на клетъчния брой (пролиферацията). Най-изявен е ефектът при 50ng/ml PDGF-BB. Резултатите ни съвпадат с доклади от предишни проучвания. Oates и съавт. (218) също установяват, че 50ng/ml е оптимална концентрация на PDGF-BB за стимулиране на пролиферацията при клетки от ПДЛ. Ojima и съавт. (220) изследват ефекта на концентрацията на PDGF-BB и времето на инкубиране на клетки от ПДЛ върху пролиферативните процеси. Те използват концентрации от 0,01 до 10ng/ml за време на третиране на клетките с РФ 24 и 48 ч. Резултатите им показват, че PDGF с концентрация 10ng/ml проявява най-добър митогенен ефект след 48 ч. инкубиране на клетките.

При работа с активни молекули, потенциращи клетъчното делене не трябва да се пропуска обсъждането на риска от неконтролируема клетъчна пролиферация. PDGF-BB както и другите РФ влияят върху развитието на неопластични процеси (89,113,306). РФ могат да бъдат част от клетъчната терапия за подготовка на клетки в *in vitro* условия, преди реплантирането им в пациенти. Рекомбинантните им форми вече намират голямо приложение и в клиничната практика (60,212). Елиминирането на опасността от развитие на нежелани реакции, включително безконтролна пролиферация на клетките, може да се осъществи чрез правилно дозиране

на РФ и установяване на оптималното време за реализиране на активността му. Нужно е провеждане на много предварителни *in vitro* експерименти, правилна оценка и добро планиране в случаите, когато РФ са средство на избор при лечението на различни патологични състояния.

## ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПО ЗАДАЧА 4

**Констатации** въз основа на резултатите:

1.PDGF-BB стимулира експресията на стволовоклетъчни маркери при МСКПДЛ. РФ поддържа клетките недиференцирани

След деленето на една стволова клетка, нейните дъщерни могат да се диференцират или да запазят стволовоклетъчните си свойства в зависимост от условията на микросредата, в която се намират (7,43,62). В организма нормално е установен баланс между процеси на делене, поддържане на стволовоклетъчните свойства и диференциацията на тези клетки (199,216). Точните механизми, по които се поддържа този баланс не са ясни, но се предполага активно участие на биологично активни вещества (66,108,170,173,151). Смятаме, че биологично активните вещества имат пряко отношение към всяка промяна в клетъчния фенотип и към експресията на стволовоклетъчни маркери. В настоящото изследване се установява влиянието на PDGF-BB върху експресията на стволовоклетъчни маркери в клетъчна култура от ПДЛ. Клетките се култивират в хранителна среда с 50ng/ml от РФ до достигане на 80-85% конфлуентност. Високата плътност (>85%), респ. прекалено близките междуклетъчни контакни могат да повлияят маркерната експресия. От наши наблюдения върху клетъчни култури установяваме, че пролиферативният и диференциационният потенциал на стволовите клетки

се променят при липса на достатъчно пространства между тях. Предполагаме, че това се дължи на реципрочните взаимодействия между близкостоящи клетки. Последните си влияят взаимно чрез отделяне на биологично активни вещества по време на клетъчното култивиране. Известно е, че продуцираните от едни клетки активни молекули могат да влияят върху други по автокринни, паракринни и телекринни пътища и така да водят до изменения в свойствата им (23,166).

Клетките за експеримента по установяване ефектите на PDGF-BB върху експресията на маркери се култивират в безсерумна среда. Този дизайн на експериментите е избран подари описани вече недостатъци на ФТС. Основен проблем е невъзможността за дефиниране на количествения и качествения му състав по отношение на активни молекули.

Анализът на резултатите показва, че при контролните клетки (култивирани в среда без РФ) маркерът CD105 се експресира в 31,29±2,68% от популацията, а при третираните с PDGF-BB експресията е повишена до 65,31±5,47%. Маркерът CD146 се експресира в 23,27±0,35% от контролните клетки и в 61,63±5,65% от клетките, култивирани с РФ. От литературните източници е известно, че и двата използвани маркера се асоциират със стволовоклетъчен фенотип (82,135,241).

До момента не бяха намерени данни в литературата, които доказват ефекта на PDGF-BB върху експресията на стволовоклетъчни маркери при клетки, изолирани от ПДЛ. В настоящото проучване се доказва за първи път влиянието на този РФ върху стволовоклетъчните свойства след *in vitro* култивиране.

Установената от резултатите ни способност на PDGF-BB да поддържа клетъчната дедиференциация има голямо значение за приложението му в *in vitro* и в *in vivo* изследвания. Данните от експериментите ни, които сме анализирали до момента показват, че тази активна молекула стимулира пролиферацията на клетки от ПДЛ с

оптимален ефект при концентрация от 50ng/ml. Същата тази концентрация на РФ има способността да увеличава експресията на стволовоклетъчни маркери. Следователно PDGF-BB активно стимулира самообновяването на МСК. Включването на PDGF-BB в културелната среда на МСКПДЛ ще съхрани стволовоклетъчния фенотип за по-дълго време и ще забави клетъчното „стареене“. Очаква се, че в *in vitro* условия PDGF-BB ще повиши клетъчната преживяемост и клетъчния брой. Тази негова функция може да допринесе за решаване на проблема, свързан с недостига на МСК, изолирани от тъканите с цел последващото им локално аплициране в клиниката.

Освен, че потвърждават стволовоклетъчния фенотип, изследваните маркери CD105 и CD146 се асоциират с инициирането на туморен растеж и развитието на метастази (101,320). Значението на РФ за туморогенезата е добре известно. Всички морфогени от семейството на PDGF се асоциират с развитието на неоплазми (61,223,306). Рецепторите им се експресират от редица туморни клетки. Повишената експресия на РФ корелира с туморния растеж, локална инвазивност и развитие на метастази, лекарствена резистентност и лоша прогноза (61,223,306). Клиничното приложение на рекомбинантни РФ трябва да става с презумпцията за вероятни нежелани реакции. Нежеланите реакции са свързани от една страна с недостатъчен терапевтичен ефект на агента и липса на контрол върху клетъчната пролиферация – от друга. Въпреки това, до момента не сме намерили данни в литературата, които сочат, че локалното аплициране на rhPDGF инициира развитието на неопластичен процес.

В тромбоцитите и в автоложните ТК има голям брой различни РФ и цитокини (55,57,321). Те функционират заедно и допълват взаимно функциите си. В настоящия научен труд се изследва самостоятелно ефектът на PDGF-BB. Други активни молекули не са включени в опитната постановка. Резултатите ни имат значение за клиниката най-вече при

лечение на заболявания в лицево-челюстната област с рекомбинантна форма на PDGF-BB.

## ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПО ЗАДАЧА 5

**Констатации** въз основа на резултатите:

1.PDGF-BB потиска синтеза на общ колаген при МСКПДЛ

2.PDGF-BB потиска експресията на колаген тип I, който е основен протеин в ЕЦМ на ПДЛ. Експресията на колаген тип III не се променя от активността на РФ. Следователно, PDGF притежава селективен инхибиторен ефект.

3.PDGF-BB повишава активността на ензима LOX в периодонтални стволови клетки. Този ензим катализира матурацията на колагеновите молекули екстрацелуларно. Следователно, PDGF-BB стабилизира структурата на ЕЦМ в периодонциума. Ефектът му е концентрационнозависим

4.PDGF-BB увеличава значимо експресията на SPARC – ензим свързан с матурацията на екстрацелуларната колагенова мрежа.

Освен чрез силна митогенна активност, РФ участват в тъканната регенерация и посредством стимулиране на матриксния синтез (180,266,273). Фактът, че PDGF-BB е един от основните РФ, предполага неговото централно място в процесите на изграждане на колагеновите молекули при клетки от ПДЛ.

Основен елемент в ЕЦМ на ПДЛ е колагенът (310). Поради тази причина изследвахме детайлно ефектите на PDGF върху продукцията и експресията на колаген при МСКПДЛ. Синтезът и обмяната на колагена са

сложни процеси, в които вземат участие голям брой активни молекули (38,39,127,166,276).

В настоящото проучване се използват няколко различни метода за доказване влиянието на PDGF-BB върху синтеза на колаген в клетъчна култура от ПДЛ. Изследват се тоталният разтворим колаген, произведен от клетките, експресията на двата основни типа колаген и SPARC, както и активността на ензима LOX.

Изследване на общото количество разтворим колаген синтезиран от клетките се провежда след период от едноседмично култивиране. Използва се безсерумна хранителна среда с две селектирани концентрации PDGF-BB: 10ng/ml и 50ng/ml. Резултатите показват, че инкубация на клетки с РФ в концентрация 10ng/ml не води до промяна в синтезните процеси в сравнение с контрола. Прилагането на PDGF-BB в концентрация 50ng/ml води до супресия върху колагеновата продукция и синтез. С повишаване на концентрацията на РФ се стига до значимо намаляване на общото количество секретиран колаген при периодонтални МСК. Установява се, че ефектът на PDGF е дозо-зависим.

Основно значение за бъдещата употреба на rhPDGF-BB в клиниката има уточняването на оптималните концентрации, които инициират и поддържат тъканната регенерация. По тази причина в експериментите, които провеждаме търсим концентрацията на PDGF, потенцираща и респ. инхибираща в най-висока степен клетъчните функции.

Съпоставянето на резултатите от експеримента по отчитане на тоталния синтезиран колаген и този по пролиферативната активност на клетките показва, че концентрацията на РФ влияе в обратнопропорционална зависимост. При аплицирането на по-високи концетрации PDGF-BB ще се стимулира клетъчното делене, но ще бъде инхибирана колагеновата продукция и обратно.

В изследване, провденето от Matsuda и кол. (193) се констатира, че PDGF-AB (една от другите изомерни форми на PDGF) увеличава синтеза на колаген в плъши клетки от ПДЛ. Резултатите им значително се различават от нашите. Това се дължи на няколко факта. Те не изследват различни концентрации на РФ. Прилагат само една концентрация и не констатират дозо-зависим ефект на PDGF върху клетките. От друга страна техният експеримент се провеждат върху клетки от ПДЛ, изолирани от плъх и се прилага друга изомерна форма на PDGF. Следователно различните изомерни форми на РФ проявяват различна активност върху клетъчните процеси. Трябва да се направи по-добра оценка на влиянието, което оказва концентрацията на морфогена върху клетъчната култура.

Ojima и кол. (220) изследват едновременно ефекта на PDGF-BB върху пролиферацията и колагеновия синтез в клетъчна култура от човешки ПДЛ. Те прилагат по-ниски концентрации на РФ: от 0,1 до 10ng/ml. Резултатите им показват, че най-активен клетъчен синтез се реализира при концентрация 1ng/ml, докато при концентрация от 10ng/ml не се наблюдава значима промяна в продукцията на колаген от клетките спрямо негативна контрола. Изводите, направени от Ojima и кол. (220) допълват тези от настоящото проучване, т.е. с увеличаване концентрацията на PDGF-BB намалява потенциалът му да стимулира колагеновата продукция, респ. се засилва неговият инхибиторен ефект.

В настоящото изследване се установява влиянието на PDGF-BB върху експресията на колаген тип I и III в клетъчна култура от ПДЛ чрез флоуцитометрия след 48ч. култивиране. Използвана е само една концентрация на РФ – 50ng/ml. Резултатите, коментирани до тук показват, че именно тази концентрация води до инхибиране на продукцията на общ колаген от клетките. Тези данни, обаче не дадоха информация дали РФ проявява селективна активност по отношение на различните типове колаген в ЕЦМ на ПДЛ. Поради това провеждаме допълнителен

флоуцитометричен анализ, за уточняване дали PDGF-BB има различен ефект върху колаген тип I и III.

Резултатите демонстрират, че PDGF-BB в концентрация 50ng/ml в малка степен потиска експресията на колаген тип I. От друга страна експресията на колаген тип III остава непроменена. PDGF има способността селективно да понижава експресията на определени типове колаген. Важно е да се отбележи, че той инхибира именно най-разпространения колаген в ЕЦМ на ПДЛ.

Данните от изследванията, проведени от Ojima (220) също показват, че повишаването на концентрацията на PDGF води до потискане на тоталната колагенова продукция, както и на експресията на основния протеин в ЕЦМ на ПДЛ при човека-тип I колаген.

Резултатите ни до момента потвърждават, че PDGF-BB има способност да контролира клетъчната активност по отношение на пролиферация и синтез на колаген. Ако този морфоген се аплицира върху пациенти локално, непосредствено след тъканно увреждане би довел до интензивна клетъчна пролиферация. На този етап от лечението, локалната концентрация на РФ е висока. На по-късен етап от тъканната регенерация концентрацията на PDGF-BB се понижава (изчерпва се), понижава се митогенният му ефект и се засилва синтеза на ЕЦМ. Оптималните концентрации на РФ за локално приложение *in vivo* трябва бъдат конкретизирани след провеждане на допълнителни изследвания.

Продукцията на колаген *in vivo* е многоетапен процес, регулиран от редица колаген-асоциирани и неспецифични матриксни протеини (38,39,127,166,276). LOX е сред основните екстрацелуларни ензими, които участват в синтеза и матурацията на ЕЦМ (84). Ензимът се продуцира от много клетъчни типове (84). LOX катализира образуването на силно реактивоспособни алдехидни групи от лизиновите остатъци в прекурсорните колагенови молекули (84,145,257). Именно тези алдехидни

групи са в основата на формирането на ковалентни връзки между колагеновите вериги (257). Този процес протича след като молекулите колаген са синтезирани и секретирани вече от клетката в ЕЦМ. Извършват се конформационни промени, които значително повишават стабилността на колагена и понижават разтворимостта му (84,257). Описаните процеси би следвало да водят до повишена резистентност на колагеновите фибри към механично натоварване и към активността на протеолитични ензими. LOX участва и в много други биологични процеси, вкл. и в туморогенезата (28,177). Доказано е, че високите нива на този ензим се асоциират с някои злокачествени новообразувания като меланома, рака на гърдата (149) и белодробния карцином (251).

До момента не са провеждани изследвания, които доказват промяна в лизилоксидазната активност при клетки от ПДЛ под действието на PDGF. Функциите, които този ензим притежава го правят интересен обект на научни проучвания.

В настоящото изследване, активността на ензима LOX в МСК от ПДЛ се установява посредством функционален тест. И тук целта е да разкрие дали има концентрационна зависимост по отношение на ефекта на PDGF-BB върху ензимната активност. Промяна в активността на LOX след третиране на клетките с PDGF-BB би означавало, че РФ влияе върху матурацията на колагена в извънклетъчното пространство на съединителната тъкан и върху механичната стабилност на ПДЛ.

Резултатите от проведения експеримент показват, че по-ниските концентрации на PDGF-BB (1ng/ml и 10ng/ml) не оказват влияние върху лизилоксидазната активност при клетки от ПДЛ. При култивиране на клетките с концентрации от 50ng/ml и 100ng/ml се наблюдава значимо увеличаване на активността на ензима. Следователно PDGF-BB участва в правилното организиране и стабилизиране на колагена, респ. във формирането на пълноценен периодонтален ЕЦМ. Отново доказваме и

значението на концентрацията на приложеното активно вещество за оптималното протичане на биологичните процеси.

Друг интересен протеин, чийто функции се асоциират с иницииране на различни диференциационни клетъчни процеси е SPARC. Това, което го прави атрактивен обект на изследване е, че SPARC представлява колаген-свързващ протеин от една страна, а от друга е свързан с иницииране и поддържане на клетъчна минерализация. SPARC участва активно в колагеновата фибрилогенеза в ЕЦМ и се експресира в тъкани с добри възможности за реорганизация на ЕЦМ, вкл. и в ПДЛ; отделя се от остеобласти и се свързва с калциеви йони по време на минерализация; участва в туморогенезата (121,188).

Чрез флоуцитометрия се изследва влиянието на PDGF-BB върху експресията на SPARC. Използвана е само една концентрация на РФ. Според резултатите, PDGF-BB силно повишава експресията на SPARC при клетки от ПДЛ.

В настоящия научен труд разглеждаме LOX и SPARC като протеини, ангажирани с колагеновата матурация. Сходният ефект, който PDGF проявява върху двете изследвани активни молекули позволява да се направи заключение, че РФ стимулира матриксните промени в ПДЛ.

Установяваме, че PDGF-BB има противоположен ефект върху процесите на синтеза на колаген и неговата матурация. Следователно този РФ осъществява контрол върху синтезните процеси в организма. PDGF допринася за стабилизиране на вече изградената колагенова мрежа в екстрацелуларното пространство в комбинация с редукция на протеиновата продукция от клетките в ПДЛ *de novo*. Резултатите ни сочат, че активността на PDGF-BB е свързана с превенция на патологични процеси, при които се реализира свръхпродукция на колаген в тъканите и последващо фиброзиране.

Има проучвания, които доказват, че PDGF-BB увеличава стабилността и здравината на тъканите при инцизионни рани с 30-50% в рамките на три седмици и с около 30% при ексциозионни рани (232). Предполагаме, че тези възможности на PDGF са свързани именно със способността му да поддържа колагеновата матурация в ЕЦМ. Очаква се с напредване на оздравителния процес локалната концентрация на РФ да се изчерпа заедно с неговата активност, за да не се стигне до инициация на нежелани реакции и усложнения.

В настоящото проучване синтезът на колаген и неговата матурация в се разглеждат като отделни процеси, които се инициират и поддържат от различни ензими и активни молекули. Резултатите ни до момента разкриват на кой етап от формирането на колагеновите молекули, респ. на ЕЦМ се проявява активността на PDGF-BB. Биологичните процеси протичат с участие на редица морфогени. PDGF-BB функционира в комбинация с други РФ. Всеки отделен РФ се очаква да реализира своята активност в точно определен момент, отключвайки специфични клетъчни процеси.

## ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ПО ЗАДАЧА 6

**Констатации** въз основа на резултатите:

1.PDGF-BB инхибира активността на ензима ALP – ранен маркер за остеогенна диференциация, в МСКПДЛ. Ефектът на PDGF е концентрационнозависим

2.PDGF-BB потиска формирането на минерални нодули в клетъчни култури от периодонтални МСК след продължително култивиране

3.Експресията на минерализационния маркер BSPII при МСКПДЛ остава не повлията след третиране с PDGF-BB

Установено е, че една от характерните особености на МСКПЛД е способността им да поемат по пътя на остеогенна диференциация при подходящи условия (248). Най-честите признаци доказващи, че клетките са се диференцирали до остеобластоподобни е образуването на калциеви натрупвания във вид на нодули и експресията на маркери като ALP, BSPII, остеокалцин и др. (12,147,228,229,248,254,259).

Активните молекули в микросредата играят важна роля в клетъчните процеси на минерализация. Kawase и съавт. (147) изследват как би повлияла среда с PRP върху остеогенната диференциация на клетки от ПДЛ. Резултатите от проведеното от тях проучване не са убедителни, тъй като само част от изследваните остеогенни маркери показват значимо повишена експресия. PRP съдържа плеяда от активни молекули, които се освобождават в средата (1,3,92,94,97). Именно на тях се дължи потенциалът на PRP да стимулира клетъчното делене и диференциация. ТК съдържа множество активни молекули, всяка от които е с индивидуална специфична активност спрямо клетъчните процеси. Поради тази причина смятаме за необходимо да бъдат изследвани детайлно функциите на всеки отделен РФ. Това може да стане с прилагането на рекомбинантните им форми както в *in vitro*, така и в клинични експерименти.

В настоящото проучване се разкрива ефектът на PDGF-BB върху минерализацията посредством двата най-често прилагани теста за тази цел. Това са разкриване активността на ензима ALP чрез функционален тест и установяване способността на клетките за образуване на калциеви отлагания с помощта на багрилото Alizarin red. Изследва се, също така промяната в експресията на маркера BSPII – основен протеин в ЕЦМ на минерализираните тъкани в организма. Тези методи на изследване са достатъчно показателни за да можем да направим необходимите заключения. Използват се различни концентрации PDGF-BB. Така се установява дали РФ влияе върху остеогенната диференциация и дали

съществува концентрационна зависимост. Това би имало значение за прилагането на рекомбинантната форма на PDGF-BB в клиничната практика, подчертавайки отново правилното дозиране на морфогена като основен фактор за изхода от лечението.

За изследване активността на ALP, клетките се култивират за период от една седмица в безсерумна среда с PDGF-BB. Този период на третиране преценяваме като напълно достатъчен, защото ALP е ранен маркер за остеогенна диференциация. ALP може да бъде както свързана с рецептори по клетъчната стена, така и да бъде секретирана от клетката в хранителната среда *in vitro*, респ. ЕЦМ. По тази причина се изследват паралелно супернатанта и клетъчен лизат.

И при двата експеримента (в супернатанта и в клетъчен лизат) се установява статистически значимо понижение на ALP-активност при МСКПДЛ, култивирани с PDGF-BB. Инхибирането на ензимната активност е концентрационнозависимо. При по-висока концентрация от 50ng/ml инхбиторният ефект на PDGF-BB е по-голям.

Описаните резултати са в съгласие с изследване проведено от Zaman и кол. (314). Тяхната методика и експериментална постановка значително се различава от гореописаната, но и те установяват, че PDGF не стимулира ALP-активност при клетки от ПДЛ.

Изследва се влиянието на няколко концентрации PDGF-BB върху образуването на калциеви нодули. Клетките са култивирани в безсерумна среда с РФ за период от три седмици. В този експеримент клетките са отглеждани за по-дълъг период. През това време постепенно се оформят струпвания от клетки, в които се очаква да протече засилена минерализация. Тези струпвания обичайно са лесно видими дори с просто око след оцветяване с Alizarin red. Ализарин или 1,2-дихидроксиантраквинон е органично багрило. Той се свързва с отлагания на калциеви йони в тъканните препарати и служи като маркер за

минерализация на матрикса (117). Калцифицирането на екстрацелуларния матрикс се асоциира с изграждането на истинска кост или костоподобни структури в тъканите. Резултатите ни показват, че дори много ниски концентрации на PDGF-BB водят до потискане на минерализацията при изследваните клетки. Въпреки, че са включени четири различни концентрации (1ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml и 100ng/ml) не се установява статистически значима концентрационна зависимост на инхибиторния ефект на РФ върху минерализацията.

Прилага се флоуцитометрия за количествена оценка експресията на BSPII, като още един метод, с който да се докаже ефектът на изследвания РФ върху остеогенната диференциация. BSPII е значителна съставна част на минерализираните тъкани: кост, дентин, цимент; счита се, че този протеин представлява около 8% от всички неколагенови протеини в костта и цимента (104). Флоуцитометричният анализ показва, че няма промяна в експресията на BSPII при клетки от ПДЛ третирани с РФ в сравнение с контрола от клетки, култивирани в безсерумна хранителна без добавен PGDF-BB. Тези резултати, не противоречат на резултатите от предходните проведени експерименти, свързани с минерализация. Клетките са култивирани с РФ само за 48ч. преди флоуцитометричния анализ, докато анализът в промяната на ALP-активност и оцветяването с Alizarin red са проведени след период на третиране с PDGF-BB от една седмица и три седмици съответно. Това сочи, че е нужна по-продължителна експозиция на клетките с РФ за реализиране на инхибиторното му действие върху минерализацията.

Kratchmarova и кол. (153) изследват влиянието на PDGF върху пролиферацията и остеогенната диференциация на МСК от костен мозък. Техните резултати, подобно на нашите доказват, че РФ инициира и поддържа митотичната активност на клетките, но инхибира минерализацията.

rhPDGF-BB е прилаган в клинични експерименти по повод на пародонтални костни дефекти, фуркационни лезии и остеоинтеграция на дентални имплантати (60,194,214,215). Най-често РФ е аплициран локално в комбинация с бета-трикалциев фосфат или алогенни костни присадки. Всички тези изследвания показват, че PDGF-BB стимулира регенеративните процеси в сравнение с контроли. Те обаче не дават отговор на въпроса по какъв механизъм е протекла регенерацията в тъканите. Предвид резултатите от описаните в научния труд експерименти, може да направим извод, че PDGF-BB подпомага оздравителните процеси в костите най-вече чрез изявения си митогенен ефект и стабилизирането на колагеновите вериги в ЕЦМ. Необходимо е да изследването му в комбинация с други РФ *in vitro*, за да се установи каква е неговата роля съвместно с други активни молекули, които се намират в ТК, респективно в тромбоцитите.

След анализ на резултатите от проведените експерименти се установява тенденция за потискане на минерализационните процеси при клетки от ПДЛ след третирането им с PDGF-BB. Потискайки клетъчната и тъканната минерализация, PDGF-BB е способен на елиминира риска от развитието на патологични състояния с клинична значимост за оралната и лицево-челюстната хирургия, свързани с патологично натрупване на костна тъкан и осификация, като осифициращ периостит, периапикален остеит, хиперциментоза, анкилоза и др.

# VII.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Заключение по задача 1**

В ПДЛ на постоянни зъби има наличие на популации от стволови клетки с мезенхимен произход. Периодонтални МСК се изолират и култивират успешно в подходящи *in vitro* условия. Стволовоклетъчните култури трябва да бъдат получени от интактни зъби, екстрахирани при спазване на всички правила на антисептиката и асептиката, за да сведе до минимум рискът от заразяването им с бактериални микроорганизми. Изолирането на клетките в лабораторията за клетъчно култивиране също се извършва при стерилни условия.

Ензимната обработка преди засяването на тъканните експлантати води до лизиране на колагена и останалите протеини в периодонталния ЕЦМ. От експлантата започват да се отделят клетки, които самостоятелно „залепват“ по дъното на културелните съдове. Средно в рамките на 1 до 3 дни след засяване, вече се наблюдават първите мигрирали и адхезирали клетки. Те притежават фибробластоподобна вретеновидна или звездовидна форма. След период от 7-10 дни се установяват първите колонии. Типично свойство на МСК е способността им да формират колонии в подходящи *in vitro* условия на култивиране.

Продължителното култивиране на клетките за 3 и повече седмици, води до получаването на плътен конфлуентен слой и забавяне на клетъчната пролиферация.

**Заключение по задача 2**

Характеризацията на периодонталните МСК с цел доказване на стволовоклетъчния им фенотип е направена с количествен и качествен метод, респ. флоуцитометрия и имунофлуоресценция.

Установяваме стволовоклетъчния характер на изследваната популация на базата на експресия на предварително селектирани специфични маркери. Всички включени в изследването стволовоклетъчни маркери – STRO-1, CD44, CD49f, CD105, CD117, CD146 и CD271 се експресират положително от клетките. Това доказва, че изследваните клетки в действителност са стволови.

В изолираните периодонтални МСК се открива позитивна експресия и за диференциационни маркери, асоциирани със синтез на колаген и минерализация. Това се дължи от една страна на факта, че изолираната клетъчна култура е хетерогенна. Другата основна причина за позитивната експресия на тези маркери е потенциалът на МСК да се превръщат във високо специализирани клетъчни линии при специфични *in vitro* условия.

**Заключение по задача 3**

Резултатите от изследванията ни сочат, че PDGF-BB проявява силна митогенна активност върху МСКПДЛ. Тази активност е концентрационно зависима. Всички приложени в експеримента концентрации на РФ стимулират клетъчното делене, но оптимален митогенен ефект се наблюдава при 50ng/ml.

PDGF-BB стимулира преминаването на клетките в активна фаза на делене от клетъчния цикъл (G2/M-фаза), следователно РФ влияе върху разпределнието на периодонталните МСК по фазите на клетъчния им цикъл.

Активността на PDGF-BB по отношение на клетъчната пролиферация и клетъчния цикъл се асоциират със способност на РФ за поддържане на клетъчната линия, стимулиране на репопулацията в зони с клетъчен дефицит поради различни патологични процеси и участие в тъканнорегенеративните процеси.

**Заключение по задача 4**

В зависимост от условията на култивиране *in vitro*, МСКПДЛ могат да запазят стволовоклетъчните си свойства или да поемат по пътя на диференциация. Горните резултати показват, че PDGF-BB стимулира експресията на специфични стволовоклетъчни маркери в периодонтални МСК, т.е. има потенциал да запазва клетките недиференцирани. Експресията и на двата маркера – CD105 и CD146 е значимо увеличена след третиране на клетките с PDGF-BB. Този ефект на PDGF е от голямо значение за превенция на процесите на клетъчно стареене и за съхраняване на стволовоклетъчните свойства на клетките за дълъг период.

**Заключение по задача 5**

За оценка ефекта на PDGF-BB върху формирането на пълноценен периодонтален ЕЦМ изследваме влиянието му върху експресията на колаген в МСКПДЛ, върху тоталния синтезиран колаген от клетките и върху функцията на молекули, стимулиращи колагеновата матурация. Колаген тип I и III са основни протеини в ПДЛ. PDGF-BB в по-висока концентрация потиска експресията на колаген тип I, докато експресията на колаген тип III остава непроменена. PDGF-BB притежава специфичен селективен инхибиторен ефект върху експресията на колаген тип I. РФ инхибира и синтеза на общ колаген в МСКПДЛ. Следователно РФ потиска процеси на свръхпродукция на колаген и фиброзиране в ПДЛ.

Изследван е ефектът на PDGF-BB върху активността на LOX – основен екстрацелуларен ензим, отговорен за формирането на интра- и интермолекулярни ковалентни връзки между колагеновите вериги. Резултатите ни показват, че по-високите концентрации на РФ повишават ензимната активност на LOX. PDGF-BB повишава и експресията на SPARC при МСКПДЛ. SPARC притежава активност, сходна с тази на LOX по отношение на колагена в ЕЦМ. Това означава, че функцията на PDGF-

BB насочена по-скоро към иницииране и поддържане на колагеновата матурация екстрацелуларно. РФ води до стабилизиране на вече синтезираните протеинови молекули в извънклетъчното пространство и понижаване на разтворимостта им. PDGF-BB участва във формирането на пълноценен периодонтален ЕЦМ.

**Заключение по задача 6**

PDGF-BB проявява инхибиторен ефект върху минерализационните процеси при популациите от МСКПДЛ. Резултатите ни сочат, че РФ потиска активността на ензима ALP (ранен маркер за остеогенна диференциация) и понижава способността на МСКПДЛ да формират калциеви нодули след продължително *in vitro* култивиране. Ефектът на PDGF-BB върху стволовоклетъчните култури е насочен към превенция на ранна минерализация и остеогенеза. РФ понижава риска от развитие на патологични процеси, свързани с абнормно натрупване на костна тъкан в периодонциума като хиперциментоза и анкилоза.

С проведените от нас експерименти и резултатите се изяснява и конкретизира значението на PDGF-BB за МСК и за биологичните процеси в ПДЛ. Ефектът на PDGF-BB е насочен най-вече към ранната фаза на тъканната регенерация. Тогава концентрацията на РФ е най-висока, респ. и неговата активност. На този етап е най-важно да бъде стимулирана клетъчната пролиферация и да има наличие на достатъчно недиференцирани МСК в ПДЛ. PDGF-BB води до формирането на стабилен ЕЦМ и понижава риска от преждевременна фиброза и минерализация в тъканите.

Информацията, която получаваме от резултатите има основно практическо значение за правилното приложение на рекомбинантната форма на PDGF-BB в клиничната практика. Установеният модел на влияние на rhPDGF-BB върху МСКПДЛ може да служи като основа за

разработване на терапевтични методики, които да подобрят условията за интеграция на дентални имплантати, да подпомогнат регенерацията при реплантиране на експулсирани зъби, при хирургично лечение на пародонтални костни лезии и т.н.

# VIII.ИЗВОДИ:

1.Клетките, изолирани от ПДЛ на човешки постоянни зъби притежават типична морфология на МСК. Имат фибробластоподобна форма, формират колонии и успешно се култивират *in vitro* в автокринна среда.

2.Изолираните МСКПДЛ експресират следните стволовоклетъчни маркери: CD44, CD49f, CD105, CD117, CD146, CD271, STRO-1. На базата на положителната експресия за изброените маркери, можем да потвърдим, че изследваните клетки в действителност са стволови.

3.Освен стволовоклетъчни маркери, изолираните МСКПДЛ експресират ALP, SPARC, Col1a2, Col3a1. Тези маркери се експресират от клетки, притежаващи потенциал да синтезират ЕЦМ и да инициират минерализационни процеси при подходящи условия.

4.PDGF-BB е РФ, който проявява висока биологична активност върху периодонтални стволови клетки. В повечето от проведените експерименти ефектите от тази активност са концентрационнозависими.

5.PDGF-BB влияе върху клетъчната пролиферация и клетъчния цикъл. Установява се, че РФ проявява най-висока митогенна активност при концентрация 50ng/ml. При тази концентрация броя клетки в популацията е най-значимо увеличен. PDGF-BB стимулира преминаването на клетките в активна фаза на делене (G2/M) от клетъчния цикъл.

6.PDGF-BB стимулира експресията на стволовоклетъчни маркери в клетъчната култура от ПДЛ, следователно има способност да запазва стволово-клетъчния фенотип.

7.След култивиране на МСКПДЛ в среда с PDGF-BB се наблюдава супресия в експресията на основния колаген в ЕЦМ на ПДЛ – колаген тип I, а експресията на колаген тип III остава непроменена; продукцията на общия колаген от клетките също е потисната.

8.PDGF-BB във високи концентрации повишава активността на LOX, който е отговорен за матурацията и стабилизирането на синтезираните вече колагенови молекули, респ. на ЕЦМ в ПДЛ. Това би ускорило процесите на регенерация в периодонталните структури.

9.Изследването на ензимната активност на ALP и оцветяването с Alizarin red на МСКПДЛ след третиране с PDGF-BB доказва, че РФ потиска процесите на минерализация. Това означава, че PDGF-BB понижава риска от развитие на патологични процеси като хиперциментоза и анкилоза в периодонциума.

## IX.ПРИНОСИ:

1.За първи път у нас се провежда научно-експериментална дейност в *in vitro* условия с изолирани МСКПДЛ от човешки постоянни зъби.

2.За първи път е изследван ефектът на основния РФ в тромбоцитите и в ТК – PDGF-BB върху биологичните процеси, които протичат в МСКПДЛ. Установи се оптималната му концентрация *in vitro* относно процеси на пролиферация и колагенова матурация.

3. Доказва се, че PDGF-BB може да поддържа клетките недиференцирани и да съхранява стволово-клетъчните им свойства.

4.Потвърждават се данни в литературата, според които PDGF-BB е активен митоген за периодонталните стволови клетки.

5.Доказва се, че PDGF-BB влияе върху процесите на синтез и матурация на колагена в култури от МСКПДЛ.

6.Доказва се, че PDGF-BB влияе върху процесите на минерализация в култури от МСКПДЛ.

## X.БИБЛИОГРАФИЯ:


1. Александрова М. Автоложни тромбоцитни концентрати за локално приложение-видове и класификация. Съвр Стоматол 2014; 45: 24-38.
2. Александрова М. Автоложни тромбоцитни концентрати за локално приложение-клинични приложения. Съвр Стоматол 2014; 45: 39-56.
3. Парушева С. Растежни фактори и костна регенерация. Съвр Стоматол 2015; 46: 8-30.
4. Пенева М, Митев В, Ишкитиев Н. Изолиране на мезенхимни стволови клетки от пулпа на временни зъби. Съвр Стоматол 2009; 40: 14-23.
5. Пенева М, Митев Е, Ишкитиев Н. Характеризиране на изолирани стволови клетки от пулпа на временни зъби под въздействието на растежни фактори. Съвр Стоматол 2009; 24-37.
6. Угринов Р. Лицево-челюстна хирургия. 2006; София.
7. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. Gene Ther 2008; 15: 109-116.
8. Abdanipour AR, Noori-Zadeh A, Mohamadi Z, Rashid Sheykh Ahmad F, Akbari P. Comparison of Adipose-Derived Stem Cells and Bone Marrow Stromal Cells in Prolonged Passages Based on Viability and Auto-Differentiation. J Rafsanjan Univ Med Sci 2015; 13: 1141-1152.
9. Abdullah LN, Chow EKH. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. Clin Transl Med 2013; 2: 3-12.
10. Adiwinata Pawitan J. Platelet rich plasma in xeno-free stem cell culture: the impact of platelet count and processing method. Curr Stem Cell Res Ther 2012; 7: 329-335.
11. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 2005; 105: 1815–1822.

12. Akiyama K, Chen C, Gronthos S, Shi S. Lineage differentiation of mesenchymal stem cells from dental pulp, apical papilla, and periodontal ligament. Methods Mol Biol 2012; 887: 111–121.
13. Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. Immun Ageing 2013; 10: 1.
14. Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. Mayo Clin Proc 2006; 81: 1241-1257.
15. Amable PR, Carias RB, Teixeira V, da Cruz Pacheco I, Correa do Amaral R, Granjeiro M, Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. Stem Cell Res Ther 2013; 4:67.
16. Andia I, Sánchez M, Maffulli N. Basic science: molecular and biological aspects of platelet-rich plasma therapies. Operative Techniques in Orthopaedics 2012; 22: 3-9.
17. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Genes Dev 2008; 22: 1276-1312.
18. Andreadis ST, Geer DJ. Biomimetic approaches to protein and gene delivery for tissue regeneration. Trends Biotechnol 2006; 24: 331-337.
19. Anitua E, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. Adv Drug Deliv Rev 2010; 62: 741-752.
20. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. Trends Pharmacol Sci 2008; 29: 37-41.
21. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. Biomaterials 2007; 28: 4551-4560.

22. Annunziata M, Oliva A, Buonaiuto C, Di Feo A, Di Pasquale R, Passaro I, Guida L. In vitro cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. J Periodontal Res 2005; 40: 489-495.

23. Arany PR, Huang GX, Gadish O, Feliz J, Weaver JC, Kim J, Mooney DJ. Multi-lineage MSC differentiation via engineered morphogen fields. J Dent Res 2014; 0022034514542272.

24. Arnoczky SP, Shebani-Rad S. The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know. Sports Med Arthrosc Rev 2013; 21: 180-185.

25. Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: a literature review. Implant Dent 2009; 18: 303-310.

26. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kubler NR, Wurzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33: 60-70.

27. Asadi M, Alamdari DH, Rahimi HR, Aliakbarian M, Jangjoo A, Abdollahi A, Khayamy ME. Treatment of life-threatening wounds with a combination of allogenic platelet-rich plasma, fibrin glue and collagen matrix, and a literature review. Exp Ther Med 2014; 8: 423-429.

28. Atsawasuwan P, Mochida Y, Katafuchi M, Kaku M, Fong KS, Csiszar K, Yamauchi M. Lysyl oxidase binds transforming growth factor-beta and regulates its signaling via amine oxidase activity. J Biol Chem 2008; 283: 34229-34240.

29. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. J Cell Biochem 2003; 89: 1235-1249.

30. Balasubramanian V, Onaca O ,Enea R, Hughes DW, Palivan CG. Protein delivery: from conventional drug delivery carriers to polymericnano- reactors. Expert Opin Drug Deliv 2010; 7: 63-78.

31. Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, Tomic-Canic M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen 2014; 22: 569-578.
32. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen. 2008; 16: 585-601.
33. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 568-584.
34. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Moseley A. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol 2002; 30: 42-48.
35. Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. The periodontal ligament. A unique, multifunctional connetctive tissue. Periodontol 2000 1997; 13: 20-40.
36. Belal MH, Watanabe H, Ichinose S, Ishikawa I. A time-dependent effect of PDGF-BB on adhesion and growth of cultured fibroblasts to root surfaces. Oral Dis 2006; 12: 543-552.
37. Benatti BB, Silverio KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr FH. Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering ligament cells. J Biosci Bioeng 2007; 103: 1-6.
38. Bentovim L, Amarilio R, Zelzer E. HIF1alpha is a central regulator of collagen hydroxylation and secretion under hypoxia during bone development. Development 2012; 139: 4473-4483.
39. Berg RA, Prockop DJ. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydrohyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. Biochem Biophys Res Commun 1973; 52: 115-120.
40. Bergel S. The effects of fibrin. Dtschr Med Wochenschr 1909; 35: 633-665.
41. Berkovitz BKB. The periodontal ligament in health and disease. 2nd ed. London: Mosby-wolfe; 1995.

42. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Oral anatomy, histology and embryology. 4th ed. London: Mosby-Elsevier; 2014. ISBN 9780723435518

43. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. Nature 2001; 414: 118-121.

44. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell 2008; 2: 313-319.

45. Blazevic T, Schwaiberger AV, Schreiner CE, Schachner D, Schaible AM, Grojer CS, Atanasov AG, Werz O, Dirsch VM, Heiss EH. 12/15-Lipoxygenase contributes to platelet-derived growth factor-induced activation of signal transducer and activator of transcription 3. J Biol Chem 2013; 288: 35592-35603.

46. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. Folia Histochem Cytobiol 2006; 44: 215-230.

47. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Biol Med 1992; 200: 165-170.

48. Bongso A, Fong CY, Gauthaman K. Taking stem cells to the clinic: major challenges. J Cell Biochem 2008; 105: 1352-1360.

49. Bowen-Pope DF, Malpass TW, Foster DM, Ross R. Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance. Blood 1984; 64: 458-469.

50. Boyan LA, Bhargava G, Nishimura F, Orman R, Price R, Terranova VP. Mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to the different isoforms of plateletderived growth factor. J Dent Res 1994; 73: 1593-1600.

51. Boyapati L, Wang LH. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. Implant Dent 2006; 15: 160-170.

52. Boyko GA, Melcher AH, Brunette DM. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. J Periodontal Res 1981; 16: 73-88.

53. Braccini F, Dohan DM. The relevance of Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) during facial aesthetic lipostructure (Coleman's technique): preliminary results. Rev Laryngol Otol Rhinol 2007; 128: 255-260.

54. Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EH. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. Eur J Orthod 1997; 19: 29-37.

55. Burnouf T, Kuo YP, Blum D, Burnouf S, Su CY. Human platelet concentrates: a source of solvent/detergent-treated highly enriched brain-derived neurotrophic factor. Transfusion 2012; 52: 1721-1728.

56. Burnouf T, Lee CY, Luo CW, Kuo YP, Chou ML, Wu YW, Su Y. Human blood derived fibrin releasates: composition and use for the culture of cell lines and human primary cells. Biologicals 2012; 40: 21-30.

57. Burnouf T, Su CY, Radosevich M, Goubran HA, El-Ekiaby M. Blood-derived biomaterials:fibrin sealant, platelet gel and platelet fibrin glue. ISBT Sci Ser 2009; 4: 136-142.

58. Calenic B, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Kumazawa Y, Nasu M, Hirata T. Magnetic separation and characterization of keratinocyte stem cells from human gingiva. J Periodont Res 2010; 45: 703-708.

59. Calenic B, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Costache M, Tovaru M, Parlatescu I. Characterization of oral keratinocyte stem cells and prospects of its differentiation to oral epithelial equivalents. Rom J Morphol Embryol 2010; 51: 641-645.

60. Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, LynchSE, Nevins M. Periodontal regeneration in human Class II furcations using purified recombinant human platelet derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) with bone allograft. Int J Periodontics Restorative Dent 2003; 23: 213-25.

61. Cao Y. Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. Trends Mol Med 2013; 19: 460-473.

62. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991; 9: 641-650.

63. Casati ZM, Vasconcelos Gurgel CB, Goncalves FP, Pimentel PS, da Rocha Nogueira Filho G, Nociti FH, Sallum EA. Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone deffects-A pilot study in dogs. Int J Oral Maxillofac Surg 2007; 36: 132-136.

64. Célio-Mariano R, de Melo WM, Carneiro-Avelino C. Comparative radiographic evaluation of alveolar bone healing associated with autologous platelet-rich plasma after impacted mandibular third molar surgery. J Oral Maxillofac Surg 2012; 70: 19-24.

65. Cenni E, Ciapetti G, Pagani S, Perut F, Giunti A, Baldini N. Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of fibroblasts and osteoblasts. J Periodontol 2005; 76:
323-328.

66. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 2007; 25: 2739-2749.

67. Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. Acta Pharmacol Sin 2013; 34: 732-740.

68. Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. Tissue Eng Part B Rev 2010; 16: 219-255.

69. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. J Periodontal Res 2006; 41: 547-553.

70. Chen FM, Shelton RM, Jin Y, Chapple IL. Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: role, strategies, and perspectives. Med Res Rev 2009; 29: 472-513.

71. Chen FM, Zhang M, Wu ZF. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. Biomaterials 2010; 31: 6279-6308.

72. Chen Fm, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu ZF. A review of endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. Biomaterials 2010; 31: 7892-7927.

73. Cheng L C, Tavazoie M, Doetsch F. Stem cells: From epigenetics to microRNAs. Neuron 2005; 46: 363-367.

74. Cheong R, Rhee A, Wang CJ. Information transduction capacity of noisy biochemical signaling networks. Science 2011; 334: 354-358.

75. Choukroun JI, Braccini F, Diss A, Giordano G, Doglioli P, Dohan DM. Influence of platelet rich fibrin (PRF) on proliferation of human preadipocytes and tympanic keratinocytes: a new opportunity in facial lipostructure (Coleman's technique) and tympanoplasty? Rev Laryngol Otol Rhinol 2007; 128: 27-32.

76. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girardeau MO, Schoeffler C, Dohan SL. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: 56-60.

77. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan L, Dohan D. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: 299-303.

78. Chowdhary KY, George JP, Gowda P, Rao JA. Human periodontal ligament fibroblast response to rhPDGF-BB application on periodontally diseased root surfaces-in vitro. Growth Factors 2013; 31: 130-138

79. Clark R. Fibrin glue for wound repair: facts and fancy. Thromb Haemost 2003; 90: 1003-1006.

80. Clausen C, Hermund NU, Donatsky O, Nielsen H, Osther K. Homologous activated platelets stimulate differentiation and proliferation of primary human bone cells. Cells Tissues Organs

2006; 184: 68-75.

81. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. Calcif Tissue Int 2000; 66: 129-138.

82. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. Exp Hematol 2008; 36: 642-654.

83. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Norotte C. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. Cell Stem Cell 2008; 3: 301-313.

84. Csiszar K. Lysy oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. Progress in Nucleic Acid Research an Molecular Biology 2001; 70: 1-32.

85. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci 2006; 119: 2204-2213.

86. Ding G, Liu Y, Wang W. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. Stem Cells 2010; 28: 1829-1838.

87. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, Wang S. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. J Cell Physiol 2010; 223: 415-422.

88. Diss A, Dohan DM, Mouhyi J, Mahler P. Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 105: 572-579.

89. Di Stefano JF, Kirchner M, Dagenhardt K, Hagag N. Activation of cancer cell proteases and cytotoxicity by EGF and PDGF growth factors. Am J Med Sci 1990; 300: 9-15.

90. Docheva D, Haasters F, Schieker M. Mesenchymal stem cells and their cell surface receptors. Curr Rheumatol Rev 2008; 4: 155-160.

91. Dohan S, Dohan A, Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Dohan D. De l'usage des concentres plaquettaires autologues en application topique. Odontologie 2005; 1: 141-180.

92. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan L, Dohan J, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate, part I: technological concept and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod 2006; 101: 37-44.

93. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan L, Dohan J, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet related biologic features. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: 45-50.

94. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan L, Dohan J, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101: 51-55.

95. Dohan Ehrenfest DM, De Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. Growth Factors 2009; 27: 63-69.

96. Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 108: 341-352.

97. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure plateletrich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (LPRF). Trends Biotechnol 2009; 27: 158-167.

98. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8: 315-317.

99. Dong CL, Webb WR, Peng Q, Tang JZ, Forsyth NR, Chen GQ, El Haj AJ. Sustained PDGF-BB release from PHBHHx loaded nanoparticles in 3D hydrogel/stem cell model. J Biomed Mater Res Part A 2015; 103: 282-288.

100. Duarte AP, Coelho JF, Bordado JC, Cidade MT, Gil MH. Surgical adhesives: systematic review of the main types and development forecast. Prog Polym Sci 2012; 37: 1031-1050.

101. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. The FASEB J 2003; 17: 984-992.

102. Estrela C, Alencar AHGD, Kitten GT, Vencion EF, Gava E. Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. Braz Dent J 2011; 22: 91-98

103. Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, Shi S. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. Oral Diseases 2010; 16: 20-28.

104. Fisher LW, McBride OW, Termine JD, Young MF. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. J Biol Chem 1990; 265: 2347-2351.

105. Fontana A, Wrobel B. Embryogenesis, morphogens and cancer stem cells: Putting the puzzle together. Med Hypotheses 2013; 81: 643-649.

106. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell Prolif 1987; 20: 263-272.

107. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea?pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet 1970; 3: 393-403.

108. Fujii S, Maeda H, Tomokiyo A, Monnouchi S, Hori K, Wada N, Akamine A. Effects of TGF-beta 1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human periodontal ligament stem/progenitor cell line. Cell Tissue Res 2010; 342: 233-242.

109. Gammon RR, Avery N, Mintz PD. Fibrin sealant: an evaluation of methods of production and the role of the blood bank. J Long Term Eff Med Implants 1998; 8: 103-116.

110. Ganong W. Review of medical physiology. London: McGraw-Hill Companies. 2005.

111. Gault P, Black A, Romette JL, Schroeder K, Thillou F, Brune T, Wurtz T. Tissue-engineered ligament: implant constructs for tooth replacement. J Clin Periodontol 2010; 37: 750-758.

112. Gebhard C, Akhmedov A, Mocharla P, Angstenberger J, Sahbai S, Camici GG. PDGF-CC induces tissue factor expression: role of PDGF receptor alpha/beta. Basic Res Cardiol 2010; 105: 349-356.

113. George D. Targeting PDGF receptors in cancer–rationales and proof of concept clinical trials. Adv Exp Med Biol 2003; 532: 141-151.

114. Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. Bone 1996; 19: 23-37.

115. Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? Transfusion 1990; 30: 741-747.

116. Graham S, Leonidou A, Lester M, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E. Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing. Expert Opin Investig Drugs. 2009; 18: 1633-1654.

117. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red – based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem 2004; 329: 77-84.

118. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res 2002;81: 531-535.

119. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 13625-13630.

120. Gürbüzer B, Pikdöken L, Urhan M, Süer BT, Narin Y. Scintigraphic evaluation of early osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich plasma. J Oral Maxillofac Surg 2008; 66: 2454-2460.

121. Guweidhi A, Kleeff J, Adwan H, Giese NA, Wente MN, Giese T, Buchler MW, Berger MR, Friess H. Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. Ann Surg 2005; 242: 224-234.

122. Hakki S S, Bozkurt B, Hakki E E, Kayis SA, Turac G, Yilmaz I, Karaoz E. Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. J Biomed Mater Res, Part B Appl Biomater 2014; 102: 119-130.

123. Hammacher A, Hellman U, Johnsson A, Ostman A, Gunnarsson K, Westermark B. A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. J Biol Chem. 1988; 263: 16493-16498.

124. Han X, Amar S. IGF-1 signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblasts vs. gingival fibroblasts. J Dent Res 2003; 82: 454-459.

125. Hart CE, Forstrom JW, Kelly JD, Seifert RA, Smith RA, Ross R. Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. Science. 1988; 240: 1529-1531.

126. Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, Okano T, Ishikawa I. Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. Tissue Eng 2005; 11: 469-478.

127. Hausmann E. Cofactor requirements for the enzymatic hydroxylation of lysine in a polypeptide precursor of collagen. Biochimica Et Biophysica Acta 1967; 133: 591-593.

128. He Q, Chao W, Gang L. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. Stem cells 2007; 25: 69-77.

129. Heidaran MA, Pierce JH, Jensen RA, Matsui T, Aaronson SA. Chimeric alpha- and beta-platelet-derived growth factor (PDGF) receptors define three immunoglobulin-like domains of the alpha-PDGF receptor that determine PDGF-AA binding specificity. J Biol Chem 1990; 265: 18741-18747.

130. Hemmat S, Lieberman DM, Most SP: An introduction to stem cell biology. Facial Plast Surg 2010; 26: 343-349.

131. Horwitz E M, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2005; 7: 393-395.

132. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stemcells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res 2009; 88: 792-806.

133. Hughes F. Mesenchymal stem cells and periodontal regeneration. Curr Oral Health Rep 2014; 1: 1-8.

134. Hynes K., Menicanin D., Gronthos S., Bartold P. M. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration.Periodontology 2000 2012; 59: 203-227.

135. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. Bone 1992; 13: 81-88.

136. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells 2004; 22: 1338-1345.

137. Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T. High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. J Endod 2012; 38: 475-480.

138. Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Fushimi N, Mitev V, Ishikawa H. Novel Management of Acute or Secondary Biliary Liver Conditions Using Hepatically Differentiated Human Dental Pulp Cells. Tissue Eng Part A 2014; 21: 586-593.

139. Ishkitiev N, Yaegaki K, Kozhuharova A, Tanaka T, Okada M, Mitev V, Imai T. Pancreatic differentiation of human dental pulp CD117+ stem cells. Regener Med 2013; 8: 597-612.

140. Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. J Periodontology 2013; 84: 1425-1433.

141. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. Int J Lab Hematol 2013; 35: 254-261.

142. Ji K, Liu Y, Lu W, Yang F, Yu J, Wang X, Xuan K. Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. J Period Res 2013; 48: 105-116.

143. Jiang L, Ma A, Song L, Hu Y, Dun H, Daloze P, Chen H. Cartilage regeneration by selected chondrogenic clonal mesenchymal stem cells in the collagenase-induced monkey osteoarthritis model. J Tissue Eng Regen Med 2014; 8: 896-905.

144. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. Arthritis Rheum 2002; 46: 3349-3360.

145. Kagan HM, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. J Cell Biochem 2003; 88: 660-672.

146. Kaltz N, Ringe J, Holzwarth C, Charbord P, Niemeyer M, Jacobs VR, Ostendorp RA. Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. Exp Cell Res 2011; 316: 2609-2617.

147. Kawase T, Okuda K, Saito Y, Amizuka N, Suzuki H, Yoshie H. Platelet-rich plasma provides nucleus for mineralization in cultures of partially differentiated periodontal ligament cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2005; 41: 171-176.

148. Kim SH, Kim KH, Seo BM, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, Lee YM. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. J Periodontol 2009; 80: 1815-1823.

149. Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sulliman CM, Edwards EM, Sommer P, Csiszar K, Hendrix MJ. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. Cancer Research 2002; 62: 4478-4483.

150. Kobayashi M, Kawase T, Horimizu, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. Biologicals 2012; 40: 323-329.

151. Kono K, Maeda H, Fujii S, Tomokyio A, Yamamoto N, Wada N, Akamine A. Exposure to transforming growth factor-beta1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines. Cell Tissue Res 2013; 352: 249-263.

152. Krasna M, Domanovic D, Tomsic A, Svajger U, Jeras M. Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat 2007; 16: 105-110.

153. Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. Science. 2005; 308: 1472-1477.

154. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. Cell stem cell 2014; 14: 275-291.

155. Kretlow JD, Young S, Klouda L, Wong M, Mikos AG. Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial tissues. Adv Mater Deerfield 2009; 21: 3368-3393.

156. Kumar V. Robbins and Coltran pathologic basis of disease. 2010; China: Elsevier p.88-89. ISBN 978-1-4160-3121-5.

157. Kumar M, Haldia A, Acharya J, Meena D. Stem cells: an emerging and regenerative future in dentistry. Technology 2015; 1: 90-94.

158. Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. Transplantation 2000; 70: 1780–1787.

159. Lang N, Lindhe J. Clinical periodontology and implant dentistry. 6th ed. Oxford: Wiley-Blackwell. 2015. ISBN: 978-0-470-67248-8

160. Langer R. Drug delivery and targeting. Nature 1998; 392: 5-10.

161. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet 2004; 363: 1439-1441.

162. Lee J H, Um S, Jang J H, Seo B M. Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells. Cell Tissue Res 2012; 348: 475-484.

163. Lee H, Park J, Forget BG, Gaines P. Induced pluripotent stem cells in regenerative medicine: an argument for continued research on human embryonic stem cells. Regen Med 2009; 4: 759-769.

164. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 2010; 141: 1117-1134.

165. Leong NL, Hurng JM, Djomehri SI, Gansky SA, Ryder MI, Ho SP. Age-related adaptation of bone-PDL-tooth complex: Rattus-Norvegicus as a model system. PloS one 2012; 7: e35980.

166. Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. J Biol Chem 2000; 275: 26967-26975.

167. Levine M. Topics in dental biochemistry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011. ISBN 978-3-540-88115-5.

168. Li B, Zhang Y, Wang Q, Dong Z, Shang L, Wu L, Jin Y. Periodontal ligament stem cells modulate root resorption of human primary teeth via Runx2 regulating RANKL/OPG system. Stem Cells Dev 2014; 23: 2524-2534.

169. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. Acta Orthop Scand Suppl 1998; 283: 2-37.

170. Liu N, Shi S, Deng M, Tang L, Zhang G, Liu N, Liu L. High levels of β-catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway. J Bone Miner Res 2011; 26: 2082-2095.

171. Liu L, Wei X, Huang R, Ling J, Wu L, Xiao Y. Effect of bone morphogenetic protein-4 on the expression of Sox2, Oct-4, and c-Myc in human periodontal ligament cells during longterm culture. Stem Cells Dev 2013; 22: 1670-1677.

172. Liu O, Xu J, Ding G, Liu D, Fan Z, Zhang C, Wang S. Periodontal ligament stem cells regulate by lymphocyte function via programmed cell death protein 1. Stem Cells 2013; 31: 1371-1382.

173. Liu W, Konermann A, Guo T, Jëager A, Zhang L, Jin Y. CanonicalWnt signaling differently modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and from periodontal ligament under inflammatory conditions. Biochim Biophys Acta 2014; 1840: 1125-1134.

174. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, Wang S. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. Stem Cells 2008; 26: 1065-1073.

175. Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. ENG (endoglin) 2012. Atlas of Genetics and cytogenetics-in-oncology-and-haematology. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ENG.html> дата на достъп 12.04.17.

176. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Picci P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. Biomaterials 2003; 24: 3095-3100.

177. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. Cell Mol Life Sci 2006; 63: 2304-2316.

178. Lundquist R, Dziegiel MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. Wound Repair Regen 2008; 16: 356-363.

179. Lynch SE. Effect of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. J Periodontol 1991; 62: 710-716.

180. Lynch SE, Castilla GRD, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN. The Effects of Short-Term Application of a Combination of Platelet-Derived and Insulin-Like Growth Factors on Periodontal Wound Healing. J Periodontol 1991; 62: 458-467.

181. Mabuchi Y, Houlihan D D, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. Prospective isolation of murine and human bone marrow mesenchymal stem cells based on surface markers. Stem Cells Int 2014; 32: 1408-1419.

182. Maegawa N, Kawamura K, Hirose M, Yajima H, Takakura Y, Ohgushi H. Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)

and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). J Tissue Engin Regener Med 2007; 1: 306-313.

183. Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization - A Systematic Review of the Literature. Open Orthop J 2011; 5: 253-260.

184. Marcopoulou CE, Vavouraki HN, Dereka XE, Vrotsos IA. Proliferative effect of growth factors TGF-beta1, PDGF-BB and rhBMP-2 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells J Int Acad Periodontol 2003; 5: 63-70.

185. Margolis DJ, Bartus C, Hoffstad O, Malay S, Berlin JA. Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. Wound Repair Regen 2005; 13: 531-536.

186. Marques LF, Stessuk T, Camargo IC. Platelet-rich plasma (PRP): Methodological aspects and clinical applications. Platelets 2015; 26: 101-113.

187. Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7634-7638.

188. Martinek N, Shahab J, Sodek J, Ringuette M. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? J Dent Res 2007; 86: 296-305.

189. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin (ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. PNAS 2013; 110: 4563-4568.

190. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62: 489-496.

191. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt R, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 85: 638-646.

192. Matras H, Dinges H, Lassmann H, Mamoli B. Zur Nahtlosen interfaszikularen nerven transplantation im tierexperiment. Wein Med Wochenschr 1972; 112: 517-523.

193. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. J Periodontol 1992; 63: 515-525.

194. McAllister BS, Haghighat K, Prasad HS, Rohrer MD. Histologic evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB after use in extraction socket defects: a case series. Int J Periodontics Restorative Dent 2010; 30: 365-373.

195. McCawley LJ, O'Brien P, Hudson LG. Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)-mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. J Cell Physiol 1998; 176: 255-265.

196. McCulloch EA, Till JE. Proliferation of hemopoietic colony-forming cells transplanted into irradiated mice.Radiat Res. 1964; 22: 383-397.

197. Medema JP. Cancer stem cells: the challenges ahead. Nat Cell Biol 2013; 15: 338-344.

198. Mehrara BJ, Saadeh PB, Steinbrech DS, Dudziak M, Spector JA, Greenwald JA. Adenovirus-mediated gene therapy of osteoblasts in vitro and in vivo. J Bone Miner Res 1999; 14: 1290-1301.

199. Meirelles Lda S, Nardi NB: Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. Front Biosci 2009; 14: 4281-4298.

200. Michelson A. Platelets 3rd ed. St. Louis: Mosbi - Elsevier 2013 ISBN: 978-0-12-387837-3

201. Mintz PD, Mayers L, Avery N, Flanagan HL, Burks SG, Spotnitz WD. Fibrin sealant: clinical use and the development of the University of Virginia Tissue Adhesive Center. Ann Clin Lab Sci 2001; 31: 108-118.

202. Mitev V, Miteva L. Signal transduction in keratinocytes. Exp Dermatol 1999; 8: 96-108.

203. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 5807-5812.

204. Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, Takahashi H, Suzuki Y, Haraguchi N, Mori M. Emerging methods for preparing iPS cells. Jpn J Clin Oncol 2012; 42: 773-779.

205. Mojica-Henshaw MP, Morris J, Kelley L, Pierce J, Boyer M, Reems JA. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. Cytotherapy 2013; 15: 1458-1468.

206. Moraschini V, Barboza ESP. Effect of autologous platelet concentrates for alveolar socket preservation: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg 2015; 44: 632-641.

207. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biol 2005; 24: 155-165.

208. Mrozik KM, Wada N, Marino V, Richter W, Shi S, Wheeler DL, Bartold PM. Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model. Regen Med 2013; 8: 711-723.

209. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Hamada H. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. Gene Ther 2004; 11: 1155-1164.

210. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function 8th edn. St. Louis: Mosby Elsevier; 2012.

211. Navneet AS, Ramanaiake TM, Yan-Fang R, Romanos GE. Platelet rich plasma: a literature review. Implant Dent 2009; 18: 303-310.

212. Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. J Periodontol 2003; 74: 1282-1292.

213. Nevins ML, Camelo M, Schupbach P, Kim DM, Camelo JMB, Nevins M. Human histologic evaluation of mineralized collagen bone substitute and recombinant platelet-derived growth factor-BB to create bone for implant placement in extraction socket defects at 4 and 6 months: a case series. Int J Periodontics Restorative Dent 2009; 29: 129-139.

214. Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, Kao RT, Melloning JH, Hinrichs JE, Paquette DW. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. J Periodontol 2005; 76: 2205-2215.

215. Nevins M, Hanratty J, Lynch SE. Clinical results using recombinant human platelet-derived growth factor and mineralized freeze-dried bone allograft in periodontal defects. Int J Periodontics Restorative Dent 2007; 27: 421-427.

216. NIH. Stem Cell Information 2001 < http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter4 .asp >; дата на достъп 12.02.2016

217. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75kd endothelial antigen. Biochem Biophys Res Commun 2011; 413: 353-357.

218. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. J Periodontol 1993; 64: 142-148.

219. O'Connor ML, Xiang D, Shigdar S, Macdonald J, Li Y, Wang T, Duan W. Cancer stem cells: a contentious hypothesis now moving forward. Cancer lett 2014; 344: 180-187.

220. Ojima Y, Mizuno M, Kuboki Y, Komori T. In vitro effect of platelet-derived growth factor-BB on collagen synthesis and proliferation of human periodontal ligament cells. Oral Dis 2003; 9: 144-151.

221. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and

transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. J Periodontol 2003; 74: 849-857.

222. Oortgiesen D A, Walboomers X F, Bronckers A L, Meijer G J, Jansen J A. Periodontal regeneration using an injectable bone cement combined with BMP-2 or FGF-2. J Tissue Eng Regener Med 2014; 8: 202-209.

223. Östman A, Heldin CH. PDGF receptors as targets in tumor treatment. Adv Cancer Res 2007; 97: 247-274.

224. Panzarini SR, Gulinelly JL, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Brandini DA. Treatment of root surface in delayed tooth replantation: a review of the literature. Dent Traumatology 2008; 24: 277-282.

225. Papachristodoulou D, Snape A, Elliott W, Elliott D. Biochemistry & molecular biology. 5th ed. Oxford: University press 2014.

226. Papadopoulos CE, Dereka XE, Vavouraki EN, Vrotsos IA. In vitro evaluation of the mitogenic effect of PDGF-BB on human PDL cells cultured with different types of bone allografts. J Periodontol 2003; 74: 451-457.

227. Park JY, Jeon SH, Choung PH. Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. Cell Transplant 2011; 20: 271-285.

228. Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, Kim CS. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: In vitro and in vivo evaluations. J Clin Periodontol 2011; 38: 721-731.

229. Park SY, Kim KH, Gwak EH, Rhee SH, Lee JC, Shin SY, Seol YJ. Ex vivo bone morphogenetic protein 2 gene delivery using periodontal ligament stem cells for enhanced re-osseointegration in the regenerative treatment of peri-implantitis. J Biomed Mater Res Part A 2015; 103: 38-47.

230. Petersen B, Barkun A, Carpenter S, Chotiprasidhi P, Chuttani R, Silverman W, Ginsberg G. Tissue adhesives and fibrin glues. Gastrointest Endosc 2004; 60: 327-332.

231. Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. J Cell Biochem 2012; 113: 2806-2812.

232. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. J Cell Biochem. 1991; 45: 319-326.

233. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. Lancet 2005; 366: 1809-1820.

234. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-147.

235. Peran M, Marchal JA, Rodriguez-Serrano F, Alvarez P, Aranega A. Transdifferentiation: why and how. Cell Biol Int 2011; 35: 373-379.

236. Qu X, Liu T, Song K, Li X, Ge D. Induced pluripotent stem cells generated from human adipose-derived stem cells using a non-viral polycistronic plasmid in feeder-free conditions. PLoS ONE 2012; 7: e48161.

237. Rokutanda S, Yanamoto S, Yamada SI, Naruse T, Inokuchi S, Umeda M. Application of Polyglycolic Acid Sheets and Fibrin Glue Spray to Bone Surfaces During Oral Surgery: A Case Series. J Oral Maxillofac Surg 2015; 73: 1017-e1.

238. Rosenblatt A. The best treatment for avulsed permanent teeth. Evid Based Dent 2010; 11: 42-43.

239. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1974; 71: 1207-1210.

240. Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. Nat Med 1999; 5: 387-391.

241. Russel KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity

in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. Stem Cells 2010; 28: 788-798.

242. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18: 93-103.

243. Sant'Ana AC, Marques MM, Barroso TE, Passanezi E, de Rezende ML. Effects of TGF-beta 1, PDGF-BB and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. J periodontol 2007; 78: 2007-2017.

244. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. Clin Orthop Rel Res 2015; 473: 1635-1643.

245. Schliephake H. Clinical efficacy of growth factors to enhance tissue repair in oral and maxillofacial reconstruction: a systematic review. Clin Implant Dent Relat Res 2015; 17: 247-273.

246. Schwartz O, Andreasen JO. Allo- and autotransplantation of mature teeth in monkeys: a sequential time-related histoquantitative study of periodontal and pulpal healing. Dent Traumatol 2002; 18: 24-261.

247. Sensebe L, Krampera M, Schrezenmeier H. Mesenchymal stem cells for clinical application. Vox sang 2010; 98: 93-107.

248. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 2004; 364: 149-155.

249. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuiri T, Akiyama K, Shi S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. Oral Dis 2008; 14: 428-434.

250. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res 2003; 18: 696-704.

251. Shi W, Yang B, Li X, Sun S, Wang L, Jiao S. The effect of lysyl oxidase polymorphism on susceptibility and prognosis of nonsmall cell lung cancer. Tumor Biology 2012; 33: 2379-2382.

252. Shih IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. J Pathol 1999; 189: 4-11.

253. Siegbahn A, Hammacher A, Westermark B, Heldin CH. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. J Clin Invest. 1990; 85: 916-920.

254. Silvrerio KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Nociti Jr FH. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. J Periodontol 2010; 81: 1207-1215.

255. Simion M, Rocchietta I, Dellavia C. Three-dimensional ridge augmentation with xenograft and recombinant human platelet-derived growth factor-BB in humans: report of two cases. Int J Periodontics Restorative Dent 2007; 27: 109-115

256. Slapnicka J, Fassmann A, Strasak L, Augustin P, Vanek J. Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. J Oral Maxillofac Surg 2008; 66: 297-301.

257. Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. Matrix Biol 1998; 16: 387-398.

258. Smrke D, Gubina B, Damanovic D, Rozman P. Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect. Eur Surg Res 2007; 39: 170-174.

259. Song JS, Kim SO, Kim SH, Choi HJ, Son HK, Junk HS, Lee JH. In vitro and in vivo characteristics of stem cells derived from the periodontal ligament of human deciduous and permanent teeth. Tissue Engineering 2012; 18: 2040-2051.

260. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Wang S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS One 2006; 1: e79.

261. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GTJ. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. J Endod 2008; 34: 166-171.

262. Soydan SS, Uckan S. Management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with a platelet-rich fibrin membrane: technical report. J Oral Maxillofac Surg 2014; 72: 322-326.

263. Sporn M, Roberts A. Peptide growth factors and their receptors I/II. Springer-Verlag Berlin Haidelberg 2012. ISBN9783642492952.

264. Stagg J, Lejeune L, Paquin A, Galipeau J. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. Hum Gene Ther 2004; 15: 597-608.

265. Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Nociti Jr FH. Platelet-derived growth factor/insulin-like growthfactor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. Implant Dent 2000; 9: 126-131.

266. Stephan EB, Renjen R, Lynch SE, Dziak R. Platelet-derived growth factor enhancement of a mineral-collagen bone substitute. J Periodontol 2000; 71: 1887-1892.

267. Strayhorn CL, Garrett JS, Dunn RL, Benedict JJ, Somerman MJ. 1999. Growth factors regulate expression of osteoblastassociatedgenes. J Periodontol 70: 1345-1354.

268. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-β delivery into tumors. Cancer Res 2002; 62: 3603-3608.

269. Su CY, Chiang CC, Lai WF, Lin KW, Burnouf T. Platelet-derived growth factor-AB and transforming growth factor-beta1 in platelet gels activated by single-donor human thrombin. Transfusion 2004; 44: 945-945.

270. Su CY, Kuo YP, Nieh HL, Tseng YH, Burnouf T. Quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel. Transfusion 2008; 48: 2414-2420.

271. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su CH, Burnouf T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 108: 56-61.

272. Susin C, Fiorini T, Lee J, De Stefano JA, Dickinson DP, Wikesjo UM. Wound healing following surgical and regenerative periodontal therapy. Periodontol 2000 2015; 68: 83-98.

273. Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. Orthod Craniofac Res 2005; 8: 292-302.

274. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006; 126: 663-676.

275. Tamas L, Huttova J, Mistrk I, Kogan J. Effect of carboxymethyl chitin-glucan on the activity of some hydrolytic enzymes in maize plants. Chem Pap 2002; 56: 326-329.

276. Tasab M, Batten MR, Bulleid NJ. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly- folded procollagen. EMBO J 2000; 19: 2204-2211.

277. Tayalia P, Mooney DJ. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. Adv Mater 2009; 21: 3269-3285.

278. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. J Oral Maxillofac Surg 1994; 52: 161-165.

279. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998; 282: 1145-1147.

280. Thorn JJ, Sorensen H, Weis-Fogh U, Andersen M. Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33: 95-100.

281. Tozum FT, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. J Can Dent Assoc 2003; 69: 664.

282. Trackman PC. Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. J Cell Biochem 2005; 96: 927-937.

283. Trigg ME. Hematopoietic stem cells. Pediatrics 2004; 113: 1051-1057.

284. Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piattelli A, Caputi S. Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. Int J Immunopathol Pharmacol 2005; 18: 213-221.

285. Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC. Oct4 and nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. Mol Cell 2012; 169-182.

286. Tuna EB, Yaman D, Yamamoto S. What is the best root surface treatment for avulsed teeth? Open Dent J 2014; 8: 175-179.

287. Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. Biopolymer-based growth factor delivery for tissue repair: from natural concepts to engineered systems. Tissue Eng Part B Rev 2009; 15: 263-289.

288. Varkey M, Gittens SA, Uludag H. Growth factor delivery for bone tissue repair: an update. Expert Opin Drug Deliv 2004; 1: 19-36.

289. Vasita R, Katti DS. Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. Expert Rev Med Devices 2006; 3: 29-47.

290. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 2008; 8: 755-768.

291. Voswinkel J, Francois S, Simon JM, Benderitter M, Gorin NC, Mohty M, Chapel A. Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol 2013; 2: 180-192.

292. Vuola J, Bohling T, Goransson H, Puolakkainen P. Transforming growth factor beta released from natural coral implant enhances bone growth at calvarium of mature rat. J Biomed Mater Res 2002; 59: 152-159.

293. Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. J Cell Physiol 2009; 219: 667-676.

294. Wada N, Tomokiyo A, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory properties of PDLSC and relevance to periodontal regeneration. Curr Oral Health Rep 2015; 2: 245-251.

295. Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Yasui W. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. Pathol Int 2012; 62: 112-119.

296. Wang L, Shen H, Zheng W, Tang L, Yang Z, Gao Y, Jin Y. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. Tissue Eng Part A 2011; 17: 1015-1026.

297. Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. The Laryngoscope 2009; 119: 1518-1530.

298. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Daley GQ. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell 2010; 7: 618-630.

299. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler E. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. Bone 2004; 34: 665-671.

300. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler E. Growth factor levels in plateletrich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. J Craniomaxillofac Surg 2002; 30: 97-102.

301. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg 1997; 55: 1294-1299.

302. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor- BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. Diabetes Care 1998; 21: 822-827.

303. Wrotniak M, Bielecki T, Gazdzik TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. Ortop Traumatol Rehabil 2007; 9: 227-238.

304. Wu RX, Bi CS, Yu Y, Zhang LL, Chen FM.Age-related decline in the matrix contents and functional properties of human periodontal ligament stem cell sheets . Acta Biomater 2015; 22: 70-82.

305. Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. Stem Cells Cloning 2014; 7: 89-99.

306. Xue Y, Lim S, Yang Y, Wang Z, Jensen LDE, Hedlung EM,Cao R. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. Nature Med 2012; 18: 100-110.

307. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: a clinical case report. Int J Per Rest Dent 2006; 26: 363-369.

308. Yamashita T, Wang XW. Cancer stem cells in the development of liver cancer. J Clin Invest 2013; 123: 1911-1918.

309. Yamauchi M. Collagen biochemistry: an overview, vol. 6. Singapore: World Scientific Publishing; 2002.

310. Yamauchi M, Katz EP, Mechanic GL. Intermolecular crosslinking and stereospecific molecular packing in type I collagen fibrils of the periodontal ligament. Biochemistry 1986; 25: 4907-4913.

311. Yamauchi M, Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. Essays Biochem 2012; 52: 113-133.

312. Yonemura K, Raines EW, Ahn NG, Narayanan AS. Mitogenic signaling mechanisms of human cementum-derived growth factor. J Biol Chem 1993; 268: 26120-26126.

313. Yu KR, Yang SR, Jung JW, Kim H, Ko K, Han DW, Kang KS. CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. Stem Cells 2012; 30: 876-887.

314. Zaman KU, Sugaya T, Kato H. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response. J Periodontal Res 1999; 34: 244-250.

315. Zhang J, An Y, Gao LN, Zhang YJ, Jin Y, Chen FM. The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. Biomaterials 2012; 33: 6974-6986.

316. Zhang H, Jia X, Han F, Zhao J, Zhao Y, Fan Y, Yuan X. Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration. Biomaterials 2013; 34: 2202-2212.

317. Zhao YH, Zhang M, Liu NX, Lv X, Zhang J, Chen FM, Chen YJ. The combined use of cell sheet fragments of periodontal ligament stem cells and platelet-rich fibrin granules for avulsed tooth reimplantation. Biomaterials 2013; 34: 5506-5520.

318. Zheng W, Wang S, Ma D, Tang L, Duan Y, Jin Y. Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and

rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment. Tissue Engineering Part A 2009; 15: 2363-2371.

319. Zhou Y, Li Y, Mao L, Peng H. Periodontal healing by periodontal ligament cell sheets in a teeth replantation model. Arch Oral Biol 2012; 57: 169-176.

320. Zhu W, Tan Y, Qiu Q. Comparison of the propertiesof human CD146+ and CD146− periodontal ligament cells in response to stimulationwith tumour necrosis factor. Arch Oral Biol 2013; 58: 1791-1803.

321. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. Vox Sang 2003; 85: 283-289.

322. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, Hart D. CD molecules 2005: Human cell differentiation molecules. Blood 2005; 106: 3123-3126.

323. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001; 7: 211.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1: Формуляр за информирано съгласие**

Заглавие на проекта:

**Изследване влиянието на растежния фактор Platelet – deroved growth factor – BB (PDGF-BB) върху производството на колаген и остеогенната диференциация на стволови клетки от периодонтален лигамент *in vitro.***

Съгласно чл. 29 (2) от Конституцията на Република България „Никой не може да бъде подлаган на медицински, научни или други опити без неговото доброволно писмено съгласие“

Долуподписаният/ата…….....

год.....

дом. адрес.....

телефон за контакт.....

съм информиран/а за същността на проекта и съм съгласен/а да бъде използван за нуждите на проучването, екстрахиран по показания зъб.....

Дата.....

Подпис на пациента:…….

## СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ:

**Mihaylova Z,** Tsikandelova R, Stanimirov P, Gateva N, Mitev V, Ishkitiev N. Role of PDGF-BB in proliferation, differentiation and maintaining stem cell properties of PDL cells *in vitro*. *Arch Oral Biol* **IF:1.748** (Публикувана в интернет октомври 2017г.) https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.019

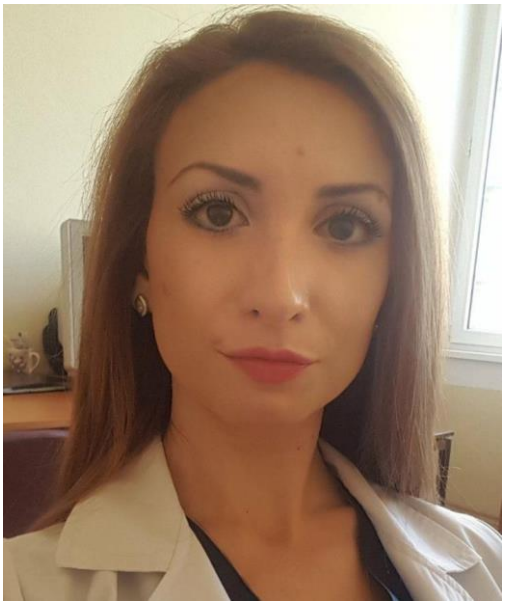
**Mihaylova Z**, Stanimirov P, Tsikandelova R, Ishkitiev N, Mitev V. Methods for proliferation, differentiation and collagen production studies of PDL stem cells. *Int J Sci Res*, 2017; 6: 1004-1007.

**Mihaylova Z**, Stanimirov P, Mitev V, Ishkitiev N. Platelet-Derived Products and Periodontal Ligament Stem Cells. *Arch Stem Cell Res,* 2015; 2(1): 1006.

## УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ:

**Mihaylova Z**, P. Stanimirov, N. Ishkitiev, V. Mitev, R. Tsikandelova, V. Dimitrova. Effect of PDGF-BB on Periodontal ligament stem cell cultures – орална презентация, *94th General Session& Exhibition of the International Association for Dental Research, юни 2016, Сеул, Южна Корея*

**Mihaylova Z**, Mitev V, Stanimirov P, Tsikandelova R, Ishkitiev N. Role of PDGF-BB in human PDL stem cells proliferation, matrix synthesis and mineralization - постерна презентация, *ISSCR 2017 Annual meeting; Бостън, САЩ 14-17 юни*



## БИОГРАФИЧНИ ДАННИ

Д-р Зорница Михайлова е родена в гр. Петрич на 01.02.1988г. През 2006г. завършва с отличие основното си образование в гимназия „П. К. Яворов“ в гр. Петрич. През 2012г. завършва висшето си образование във Факултета по Дентална медицина, МУ – София като магистър по Дентална медицина. От 2014г. е редовен асистент към Катедрата по Орална и лицево-челюстна хирургия. Занимава се с преподавателска дейност на български и чуждестранни студенти. От 2014г. извършва научно-експериментална дейност със стволови клетки от зъбни тъкани. До момента има научни публикации в български и чуждестранни реферирани списания и списания с импакт-фактор; участва в много научни проекти и в международни конференции.