М Е Д И Ц И Н С К И У Н И В Е Р С И Т Е Т – С О Ф И Я

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

АНАЛИЗ НА ЕКСПРЕСИОННИЯ И ДИФЕРЕНЦИАЦИОННИЯ ПРОФИЛ НА ОРАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ВЪЗРАСТЕН ОРГАНИЗЪМ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор” на

Марина Валериева Митева

Научни ръководители:

Акад. Проф. д-р Ваньо Митев дм, дбн

Доц. Мария Драгнева, дб

София, 2024 г.

Научно жури:

Председател:

Проф. Албена Тодорова- Георгиева, дб, дбн – вътрешен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София

Членове:

2. Доц. д-р Зорница Михайлова, дм – вътрешен член за МУ-София, Факултет по дентлана медицина при МУ-София

3. Акад. Проф. Румен Панков, дб, дбн – външен член за МУ-София, Софийски университет „ Св. Климент Охридски“

4. Проф. Татяна Влайкова, дб – външен член за МУ-София, Тракийски университет – Стара Загора

5. Проф. д-р Нешка Манчорова-Велева, дм – външен член за МУ – София, Медицински университет – Пловдив

Резервни членове:

1. Проф. Радка Кънева, дб – вътрешен резервен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София

2. Доц. Анелия Биволарска, дб – външен резервен член за МУ-София, Медицнски университет – Пловдив

Дисертационният труд съдържа **177** страници, **15** фигури и **2** таблици. Използвани са **381** литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по Медицинска химия и биохимия, Медицински Университет-София.

Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена в Лаборатория по клетъчно култивиране и сигнална трансдукция на Катедра по Медицинска химия и биохимия, Медицински Университет-София

Резултатите от работата са публикувани в три научни статии, две от тях в списания с импакт фактор на английски език и са цитирани в 2 научни публикации.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 18.10.2024 г. От 14:00 часа в сградата на ПУЦ, катедра „Медицинска химия и биохимия“, ул. Здраве 2, София.

Всички материали и документи отнасящи се до дисертационния труд са на разположение на заинтересованите в катедра „Медицинска химия и биохимия“, стая 304, ул. Здраве 2, София.

Съдържание:

1. Въведение 5

2.Цели и задачи 8

3. Материали и методи 9

3.1Изолиране и култивиране на стволови клетки 9

3.2 Характеризиране на стволови клетки от зъбен произход 13

3.3 RT-PCR 18

3.1.1 Праймери и ензими 18

3.1.2 Едностъпков RT-PCR 19

3.1.3 Праймери за обратна транскриптаза 20

3.1.4 Изисквания за двустъпков RT-PCR 20

3.1.5 Ефект на вторичната структура на РНК 21

3.1.6 Ензими използвани за RT-PCR 22

3.1.7 Мултиплексен PCR и RT-PCR 23

3.2 Тествани гени 24

3.3 Адипогенна, хондрогенна и остеогенна in vitro диференциация 25

3.4 Статистически анализ 27

4. Резултати 27

4.1 Имунофлуоресценция 29

4.2 RT-PCR 33

4.3 Пролиферативен профил 40

4.4 Потенциал за многолинейна диференциация 41

5. Дискусия 43

5.1. Стволови клетки и диференциационни маркери 44

5.2 Анализ на генна експресия 47

5.3 Пролиферативен потенциал 60

5.4 Потенциал за многолинейна диференциация 61

6. Заключение 65

7. Изводи 66

8. Приноси 66

9. Публикации във връзка с дисертационния труд 67

10. Спечелени награди 67

1. Въведение

Първите описани мезенхимни стволови клетки (MSCs) са изолирани от костно-мозъчен аспират от възрастен организъм. Те проявяват висока способност за пролиферация и имат потенциал за многолинейна диференциация. Мезенхимните стволови клетки от костен мозък (BMSC) са изследвани в различни човешки и животински моделни системи и са използвани в различни поручвания с клинично приложение, завършили с променлив успех.Трудното набавяне на BMSC, поради необходимост от инвазивна процедура, води до търсенето на алтернативни източници за стволови клетки. Така се стига до идентифицирането на стволови клетки от устна кухина (OCSC).

Понастоящем са добре известни няколко различни вида OCSC; стволови клетки от зъбна пулпа (DPSC), стволови клетки от пулпа на временни зъби (SHED), стволови клетки от пародонтален лигамент (PDLSC), стволови клетки от апикалната папила (SCAP), зъбни фоликулни стволови клетки (DFSC) и гингивални мезенхимни стволови клетки (GMSC). По време на ембрионалното развитие зъбите се формират чрез жизненоважно взаимодействие между оралните ектодермални епителни клетки - които допринасят за емайла, апикалната папила и зъбните фоликуларни структури и MSCs, отговорни за дентина, пулпата, цимента и периодонталните връзки. Повечето от зъбните MSC , които се изолират, имат ектомезенхимен произход, което им дава способността за пролиферация и специализация. Чрез своята органна функция, те имат ключова роля в развитието и запазването на зъбите и околните тъкани. DPSC са клетки, които са специализирани в регенерирането на тъканноподобни комплекси, които могат да минерализират матрица с тубули, облицовани с одонтобласти и фиброзна тъкан, съдържаща кръвоносни съдове в устройство, подобно на

пулпо-дентинния комплекс. Пародонталният лигамент (PDL) е специализирана съединителна тъкан, позната още като зъбозадържащ апарат, която свързва цимента и алвеоларната кост, за да поддържа зъбите и да запазва тъканната хомеостаза. Развитието на зъбите започва с образуването на корени от епителните клетки от цервикалната бримка, които пролиферират апикално и влияят върху диференциацията на одонтобластите, образуващи апикалната папила. Тази апикално разширяваща се двуслойна епителна стена образува епителната коренова обвивка на Herwig, която е отговорна за образуването на зъбния корен и PDL.

Първите идентифицирани зъбни мезенхимни стволови клетки са е описано от Miura et al. през 2003 г. Впоследствие са описани PDLSC, SCAP и DFSCs. Способността на различните видове стволови клетки от зъбен произход да проявяват многолинейна диференциация е изследвана задълбочено и е сравнена с тази на мезенхимните стволови клетки от костен мозък. В тези проучвания се установява, че тези от зъбен призход имат по-висока пролиферативна активност спрямо стволовите клетки от костен мозък. Въпреки регенеративните възможности на мезенхимни стволови клетки, те се намират в малки количества в тъканите. Например, BMSCs представляват само 0,001% до 0,01% от клетъчните компоненти в костния мозък. Независимо от това, тези клетки могат да бъдат култивирани in vitro, за да се идентифицират техните специфични свойства и да се оцени потенциалното им приложение в регенеративната медицина. Затова е от голямо значение разбирането на механизмите за контролиране на техните свойства и възможности. Има много изследвания, концентрирани върху отделни групи клетки, и сравняването помежду им. Например Vasandan et al. са направили сравнителен анализ на DPSC и PDLSC по отношение на техния диференциационен потенциал, докато Kunimatsi et al. изследват костната

диференциация и нивата на генна експресия на алкална фосфатаза (ALP), BMP2, Runx2 и глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (GAPDH) в SHED , DPSC и BMSC. Lei et al (18) изследват приликите и разликите между SCAP и зъбните фоликули и протеомиката и молекулярните механизми и на двете моделни системи. Smeda et al. характеризират DPSC и SCAP, с MSC маркери CD73, CD90 и CD105. Те също така са извършили количествена полимеразна верижна реакция в реално време (qRT-PCR), но тя е фокусирана само върху остеогенната регулация.

От друга стана, GMSCs са добре известни със своите регенеративни способности, които са добре проучени в пародонтологията и в оралната и лицево-челюстна хирургия. Cao et al. сравняват GMSC само с BMSC и DPSC. Обикновено изследователите се фокусират върху сравняването на ограничен набор от 2 или 3 типа клетки и когато обхватът от типове клетки се разшири, броят на анализираните маркери и гени намалява. Тестването се извършва не само върху човешки клетки in vitro, но и върху различни животински видове, като мишки и кучета, in vitro и in vivo.

Значението на нашето изследване се крие в неговата цялостна методология, която включва култивиране и детайлно изследване на всички видове клетки едновременно в рамките на една и съща контролирана среда и времева рамка. Този прецизен подход има за цел да елиминира потенциални вариации, които могат да възникнат от различни условия, като по този начин гарантира устойчивостта и надеждността на нашите открития. Въпреки съществуването на предишни изследвания по темата, нашето проучване въвежда нов аспект чрез провеждане на идентични експерименти in vitro с голям панел от маркери едновременно. Това изследване се стреми да се идентифицират, характеризират и сравнят свойствата на различните орални стволови клетки (OCSC). Използването на този иновативен подход има

значение за разбирането на разликите в генната експресия на извънклетъчните, стволовите и диференциационните маркери.

2.Цели и задачи

Целта на настоящото изследване е да се идентифицират, характеризират и сравнят свойствата на различните видове орални стволови клетки и да се установят разликите в генната експресия на техните повърхностно-клетъчни, стволово-клетъчни и диференциационни маркери.

За да постигнем поставената цел, набелязахме следните задачи:

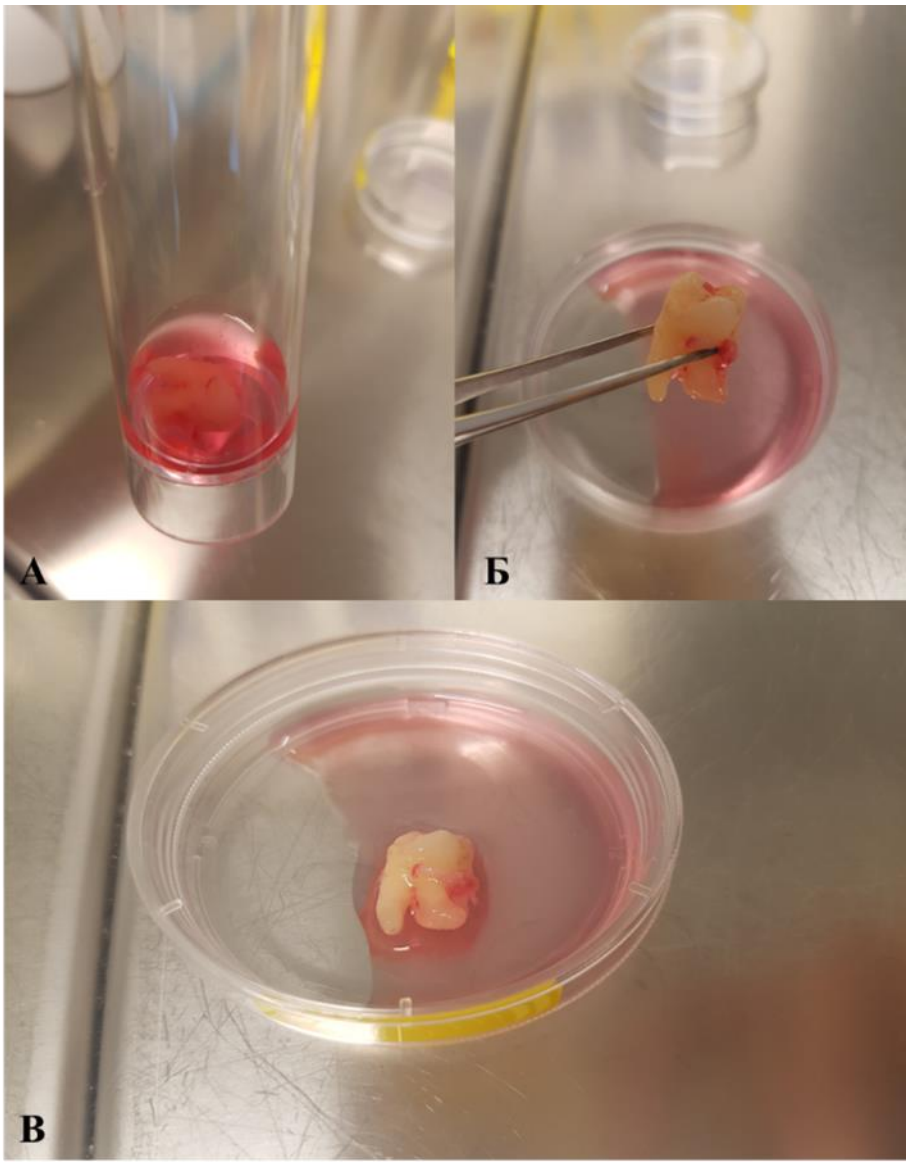
- Изолиране на първични мезенхимни хетерогенни култури от тъкани и структури в устната кухина (зъбна пулпа от постоянен и временен зъб, апикална папила от зъб с незавършено кореново развитие, периодонтален лигамент, алвеоларна кост от процесус алвеоларис, гингивална тъкан)
- Характеризиране на получените стволови клетки от орален произход чрез анализ на експресията на техните стволово-клетъчни, повърхостни и адхезионни маркери.
- Анализ на способността за диференциация на изолираните стволови клетки от орален произход към остеогенна, хондрогенна и адипогенна морфология чрез рутинни диференциационни протоколи.
- Създаване на експресионни, диференциационни и пролиферационни профили на оралните стволови клетки от възрастен организъм.

3. Материали и методи

Проучването е одобрено от Комисията по етика на Медицински университет-София. Клетки са изолирани от следните структури: зъбна пулпа от млечни и постоянни зъби, периодонтален лигамент, апикална папила, гингива и алвеоларна кост на хора на възраст под 40 години без системни заболявания и здрав орален статус. Критериите за включване в това изследване изискват интактни зъби без възпаление или кариесна инфилтрация, независимо дали са имали напълно развити корени, дали са в пробив или ретинирани. Тези зъби се екстрахират като част от ортодонтското лечение, тъй като могат да предизвикат усложнения в оклузалното развитие. Критериите за изключване обхващат зъби с кухини или обтурации, различни възпаления като пулпит и периодонтит (както остри, така и хронични), както и периапикални възпаления, което води до изключване на съответните зъби от изследването. Всички пациенти (или техни настойници), участващи в проучването, са подписали информирано съгласие преди вземането на пробата, съгласно решение на Етичната комисия на Медицински университет, СМС София (№ 4770\11.12.2018 г.). Всички екстракции на зъби са извършени в Катедрата по дентална, орална и лицево-челюстна хирургия на Факултета по дентална медицина на МУ-София, след задълбочени ортодонтски и хирургични консултации. Не са извадени зъби само за това изследване.

3.1Изолиране и култивиране на стволови клетки

МСК с орален произход бяха изолирани по утвърдени в литературата методики. Фигура 1.



Фигура 1. Пост екстрахиран зъб. А – за презервацията на зъба след екстракция, се прехвърля в стерилен контейнер със стерилна среда, за осигуряването на стерилност на тъканите. Б – преди да се сепарира коронковата от кореновата част, се отстраняват всички прилежащи

тъкани, вкл. апикална папила. В- За полесна манипулация зъбът се поставя в съд с плитко дъно, с малко стерилна среда, за да не се пресушава, докато се подготвя

SHED бяха изолирани от рутинни екстрахирани временни зъби на деца при информирано съгласие от страна на техните родители/настойници. Непосредствено след екстракцията на временния зъб, благодарение на тяхната физиологична резорбция в повечето случаи пулпната камера е отворена и има лесен достъп за кюретирането ѝ или чрез нерв- екстрактор, или Н-пила. Тъканта се екстрахира през резорбирания коренов канал на зъба. Екстрахираната пулпа се третира с разтвор на 3мг/мл колагеназа тип I и 4мг/мл диспаза (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) за 1 час на температура 37оС.

DPSC се изолират от рутинно екстрахирани осми зъби. Коронката на мъдреците се почиства с 70% спирт и се прерязва посредством стерилен диамантен пилител на 2мм на ¾ от дебелината си, на дентиновата стена на емайло-циментовата граница на зъба, без да се перфорира пулпната камера. След това механично се разделят коронковата от кореновата част на зъба. От откритата пулпна камера посредством стерилен нерв-екстрактор внимателно се екстрахира пулпата. Тъканта се третира с разтвор на 3мг/мл колагеназа тип I и 4мг/мл диспаза (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) за 1 час на температура 37оС.

PDLSC се изолират от рутинно екстрахирани зъби. След екстракцията е важно да имаме наличен здрав корен на зъба. След механичното сепариране на короната от корена и отстраняване на пулпата от вътрешността на корена. Самата коренова структура се третира с разтвор на 3мг/мл колагеназа тип I и 4мг/мл диспаза (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) за 1 час на температура 37^{o}C.

SCAP се изолирани от рутинно екстрахирани осми зъби с незавършено кореново развитие. След екстракцията на зъб с незавършено кореново развитие оператора се старае да запази и да не контаминира апикалната папила. Тъй като растежния орган е на върха на развиващия се зъб, около нея няма предпазни структури и тя лесно може да бъде контаминирана. Със стерилен скалпел и пинцета се сепарира апикалната папила от пулпата. Те имат ясно изразена анатомична и морфологична граница и лесно могат да бъдат отдиференцирани една от друга. Непосредствено след разделянето апикалната папила се третира с разтвор на 3мг/мл колагеназа тип I и 4мг/мл диспаза (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) за 1 час на температура 37^{o}C.

BMSC се изолират при рутинна екстракция на осми зъб с алвеоларна кост инфилтрирана бифуркацията на кореновата структура или при усложнена на ретиниран или полуретиниран осми зъб. При изолирането на стволови клетки от алвеоларна кост в зависимост от големината на парчето кост се натрошава на по малки парчета или се третира директно с разтвор на 3мг/мл колагеназа тип I и 4мг/мл диспаза (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) за 1 час на температура 37oC.

GMSC се изолират при рутинно отстраняване на гингивална тъкан при многобройни хирургични интервенции в устната кухина. При изолиране на гингивални мезенхимни стволови клетки, в зависимост от големината на количеството тъкан, то се сепарира на малки парчета или се третира директно с разтвор на 3мг/мл колагеназа тип I и 4мг/мл диспаза (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) за 1 час на температура 37oC.

Получената клетъчна суспензия от всеки от гореописаните източници се центрофугира за 5 минути при 1400 об/мин. Супернатантата се отстранява, а утаените клетки се ресуспендират в клетъчна среда и се засяват в 2 см петриеви панички. Клетъчната среда съдържа хранителна среда Dulbecco’s

с добавен 100 U/мл пеницилин, 100 μг/мл стрептомицин, 0,25 μг/мл амфотерицин и 20% фетален телешки серум (FBS) (Sigma-Aldrich). При достигане на 80-90% конфлуентност (средно 5-7 дни след засяването) клетките се отделят от петриевите панички чрез третиране с 0,05% трипсин (Invitrogen). Отлепените клетки се центрофугират (5 мин. при 1400 об/мин), ресуспендират (DMEM с добавка 100 U/мл пеницилин, 100 μг/мл стрептомицин, 0,25 μг/мл амфотерицин (Antibiotic-Antimycotic, Invitrogen) и 10% фетален телешки серум (FBS) и засяват с гъстота от 5x103 до 1x104клетки/см^2 в матраци за клетъчно култивиране.

3.2 Характеризиране на стволови клетки от зъбен произход

Характеризирането на DPSC, SHED, PDLSC, SCAP, BMSC и GMSC бе осъществено чрез имунофлуоресценция посредством антитела срещу множество стволово-клетъчни и диференциационни маркери. Използвани са следните антитела: конюгирани с алофикоцианин миши анти-човешки CD271 (Miltenyi Biotec), конюгирани с фикоеритрин плъши анти-човешки CD49f (Thermo Fisher Scientific Inc.), миши анти-човешки STRO1, COL1a2, COL3a1, виментин, нестин, CD44H , DSPP, 3/4 октомври (Santa Cruz Biotechnology), миши античовешки ALP (Sigma-Aldrich), заешки античовешки CK19 (Abcam), флуоресцеин-конюгиран миши античовешки CD146 (RnD Systems). Първичните неконюгирани антитела бяха при разреждания 1:250; конюгираните антитела в експеримента бяха в разреждания 1:1000. Високопроизводителен имунофлуоресцентен анализ.Клетките се инкубират със следните конюгирани антитела: конюгирани с алофикоцианин миши анти-човешки CD271 (Miltenyi Biotec), конюгирани с фикоеритрин плъши анти-човешки CD49f (Thermo Fisher Scientific Inc.), миши анти-човешки конюгирани с фикоеритрин CD90 (Beckman Coulter International SA) и Alexa Fluor 568-конюгиран заешки

анти-човешки Sox 9 (Abcam). Използвани са следните първични неконюгирани антитела: миши анти-човешки ALP (Sigma-Aldrich), миши анти-човешки CD71, CD117, COL1a2, COL3a1, виментин, нестин, CD44H, Oct 3/4, CD146 (Santa Cruz Biotechnology), миши античовешки BMP4 и FGF7 (RnD Systems).

Първичните неконюгирани антитела се използват при разреждания 1:250; конюгираните антитела в експеримента бяха в разреждания 1:1000. За имунофлуоресцентен анализ клетките се посяват в 96-ямкови плаки (TPP; 5000 клетки/cm2). След достигане на субконфлуенция, клетките се фиксират с 4% формалдехид за 30 минути и след това се промиват 3 пъти с PBS, последвано от 30 минути инкубиране с 1% говежди серумен албумин. Стъпка на пермеабилизация, състояща се от клетъчна инкубация с 0,05% Tween20 (ICN Biomedicals Inc.) за 10 минути и с 0,05% Triton X-100 (Calbiochem, Merck) за 30 минути, беше извършена за улесняване на оцветяването на вътреклетъчния маркер. След инкубиране с антитела и промиване с PBS 3 пъти, пробите впоследствие бяха насрещно оцветени с DAPI (4,6-диамидино2-фенилиндол; Invitrogen) за 15 минути, за да се визуализират ядрата. Клетъчните култури бяха наблюдавани с IN Cell Analyzer 6000 система за изобразяване/лазерна конфокална прорезна система (GE Healthcare). Клетките се посяват в 96-ямкови плаки за клетъчен анализ с високо съдържание. Бяха заснети тридесет и шест зрителни полета (увеличение x20). Анализът беше извършен чрез IN Cell Analyzer Workstation 3.7.3 (GE Healthcare). IN Cell Analyzer Workstation 3.7.3 разпознава и анализира ядрата, цитозолната и фоновата флуоресценция между 2800 и 14 000 клетки на маркер. Преброихме в клетъчния канал броя на клетките със стойности на съотношението цитозолна флуоресценция/фонова флуоресценция ≥1,1 (отрицателни клетки) и <3

(автофлуоресценция) и представихме данните в таблицата като процент от общия брой клетки.

IN Cell Analyzer 6000 е автоматизиран микроскоп, предназначен за бързо, автоматизирано изобразяване и анализ на фиксирани и живи клетки. Основният метод за изобразяване е флуоресцентна микроскопия.Фигура 2.



Фигура 5. IN Cell Analyzer 6000 (фигура взета от ръководство за употреба на IN Cell Analyzer 6000)

При флуоресцентна микроскопия пробата (например човешка клетка) се оцветява с едно или повече багрила, които се свързват с определени структури от интерес в пробата. Багрилата са предназначени да флуоресцират, когато са осветени със специфични дължини на вълната на светлината; флуоресцентната светлина, която се излъчва, също е с определена дължина на вълната. По време на изобразяване пробата се осветява от светлина с определена дължина на вълната. Това кара всички багрила със съвпадащи профили на възбуждане да излъчват светлина. Обективна леща събира флуоресцентната светлина, излъчвана от пробата, и се използват различни оптики за насочване на светлината към много чувствителна CMOS камера. Изображенията, направени с тази камера, могат да покажат например външния вид и позицията на структурите в пробата.

Работната станция е компютърна система, използвана за управление на IN Cell Analyzer 6000. Работната станция изпълнява софтуер за дефиниране и настройка на експерименти с изображения, провеждане на експерименти и анализиране на получените изображения. Всички контроли на системата IN Cell Analyzer 6000 са достъпни чрез графичния потребителски интерфейс (GUI) на работната станция. Работната станция комуникира с Imager чрез Ethernet връзка.

Имиджър

Imager съдържа всички други части на INCell Analyzer 6000, включително:

• Лазери за възбуждане - изберете определени цветове на светлината, за да възбудите един флуорофор наведнъж, избрани да покриват стандартните диапазони на възбуждане на багрилото и флуоресцентния протеин.

• Купола на обектива - снабдена с четири обектива, включително до два обектива, съдържащи нашийници за автоматизирана сферична аберация.

• Модул за лазерно автоматично фокусиране - Лазерен лъч се насочва през обектива и се фокусира върху целта. Докато z-оста се премества, фотосензор наблюдава отразения лъч, за да определи точната позиция на целта. Тази информация се връща обратно към контролния компютър, така че следващите изображения, направени от пробата, да са в най-добрата равнина на фокус.

• Поставка – Пробата се поставя в носеща плоча, която се премества върху оптиката, за да изобрази различни области на пробата. Носещата плоча лежи върху гладка плоча, за да се осигури постоянно движение.

• Емисионни филтри - позволяват определени цветове на излъчената светлина само от един флуорофор да достигнат до камерата. За улавяне на светлината и създаване на изображения се използва охладена CMOS камера.

• Камера - охлаждаща CMOS камера се използва за улавяне на светлината и създаване на изображения.

• Боравене с течности (по избор) – включва позициониращ портал, оборудван с една спринцовка и игла за прехвърляне на течност от източник до нейното местоназначение. Течните проби се аспирират или от бутилка за проби, или от определени места на плоча за проби и се разпределят в точни количества в ямки в плоча за проби. Системата поддържа аспирация и дозиране от 96 - и 384-ямкови плаки и се почиства лесно с помощта на станция за измиване, свързана с бутилка с почистващ разтвор.

• Контролна електроника - Imager съдържа бордови компютър и множество персонализирани платки за получаване на команди от работната станция и преобразуване на тези команди в движение и изображения.

Имиджърът е покрит с капаци, за да предпази от светлина и прах. Емисионната оптика е в среда с положително налягане, за да се поддържа чиста. Филтър на всмукателния отвор гарантира, че в тази зона е разрешен само чист въздух.

IN Cell Analyzer 6000 използва 5 лазера, за да осигури възбуждащо осветление.Таблица 1.

Дължина на вълната (nm)	Мощност (mW)
405	100
188	25
561	30
640	50
785 (Autofocus only)	50

Таблица 1. Дължина на вълната и начална изходна мощност на лазера.

3.3 RT-PCR

РНК се изолира от 80% конфлуентни клетки от 25 cm2 колба с RNeasy Plus Mini Kit, след това се превръща в cDNA с FastLane Cell cDNA Kit и се анализира с RT2 Profiler PCR Array, Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules Array (PAHS 013ZE; QIAGEN).

RT-PCR (обратна транскрипция-полимеразна верижна реакция) е от съществено значение за превръщането на РНК в ДНК чрез обратна транскрипция и други приложения и диагностика в молекулярната биология. Това е високочувствителна техника за количествено определяне, откриване на РНК и амплифициране на специфични ДНК сегменти за анализ.

3.1.1 Праймери и ензими

Когато се извършва RT-PCR в реално време, праймерите и ензимът за обратна транскрипция трябва да бъдат внимателно избрани. Праймерите трябва да позволяват обратна транскрипция на всички интересни мишени, а обратната транскриптаза трябва да дава количества сДНК, които точно представят оригиналните количества на РНК, за да се осигури точно количествено определяне. В допълнение, ефектите на компонентите на RT реакцията върху последващата PCR в реално време трябва да бъдат сведени до минимум.

За да се извърши PCR, като се използва РНК като начална матрица, РНК трябва първо да бъде обратно транскрибирана в сДНК в реакция на обратна транскрипция (RT). RT и PCR могат да се извършват или последователно в една и съща епруветка (едноетапна RT-PCR) или отделно

(двуетапна RT-PCR). Едноетапната RT-PCR изисква ген-специфични праймери. За нашето изследване използвахме двуетапна RT PCR.

3.1.2 Едностъпков RT-PCR

Едноетапната RT-PCR комбинира обратна транскрипция и PCR амплификация в една реакция, докато двуетапната RT-PCR разделя тези етапи, предлагайки гъвкавост при избора на праймер и потенциал за множество анализи от един cDNA синтез.

RT-PCR в реално време може да се проведе в двуетапна или едноетапна реакция. С двуетапна RT-PCR, РНК първо се транскрибира обратно в сДНК с помощта на олиго-dT праймери, произволни олигомери или ген-специфични праймери. Аликвотна част от реакцията на обратна транскрипция след това се добавя към PCR в реално време. Възможно е да избирате между различни видове RT праймери, в зависимост от експерименталните нужди. Използването на олиго-dT праймери или произволни олигомери за обратна транскрипция означава, че няколко различни транскрипта могат да бъдат анализирани чрез PCR от една RT реакция. В допълнение, ценни РНК проби могат незабавно да бъдат транскрибирани в по-стабилна сДНК за по-късна употреба и дългосрочно съхранение.

При едноетапна RT-PCR — наричана също еднотръбна RT-PCR — и обратната транскрипция, и PCR в реално време се извършват в една и съща епруветка, като обратната транскрипция предшества PCR. Това е възможно благодарение на специализирани реакционни химии и циклични протоколи (вижте Условия за едноетапна RT-PCR). Бързата процедура позволява бърза обработка на множество проби и е лесна за автоматизиране. Намаленият брой стъпки на манипулиране води до висока възпроизводимост от проба до

проба и минимизира риска от замърсяване, тъй като са необходими по-малко манипулации.

3.1.3 Праймери за обратна транскриптаза

Изборът на праймери за обратна транскрипция зависи от това дали се извършва едноетапна или двуетапна RT-PCR. В едноетапната RT-PCR праймерът за PCR надолу по веригата е също праймерът за обратна транскрипция. Следователно, едноетапна RT-PCR винаги се извършва с ген-специфични праймери. В двуетапна RT-PCR, 3 вида праймери и техни смеси могат да се използват за обратна транскрипция: олиго-dT праймери (обикновено 13-18мери), произволни олигомери (като хексамери, октамери или нономери) или ген -специфични праймери (вижте таблицата „Пригодност на типовете праймери за RT-PCR“). Ако се използват олиго-dT праймери, само иРНК ще бъдат обратно транскрибирани, започвайки от поли-А опашката в 3' края. Случайните олигомери ще позволят обратна транскрипция от цялата РНК популация, включително рибозомна РНК, трансферна РНК и малки ядрени РНК. Тъй като обратната транскрипция се инициира от няколко позиции в РНК молекулата, това ще доведе до относително къси сДНК молекули. За сравнение, ген-специфичните праймери позволяват обратна транскрипция на специфичен транскрипт.

Универсален метод за праймиране за етапа на RT на двуетапна RT-PCR в реално време трябва да позволи амплификация и откриване на всеки PCR продукт, независимо от дължината на транскрипта и позицията на ампликона, и да постигне това с висока чувствителност и възпроизводимост.

3.1.4 Изисквания за двустъпков RT-PCR

В двуетапна RT-PCR, добавянето на завършената реакция на обратна транскрипция към последващата реакция на амплификация прехвърля не

само cDNA шаблон, но също и соли, dNTPs и RT ензим. RT реакционният буфер, който има различен солев състав от този на буфера за PCR в реално време, може да повлияе неблагоприятно върху работата на PCR в реално време. Въпреки това, ако RT реакцията образува 10% или по-малко от крайния PCR обем в реално време, производителността няма да бъде значително засегната. Използването на 3 µl RT реакция в 20 µl PCR (т.е. 15% от крайния обем) може да доведе до значително инхибиране на PCR в реално време. Препоръчваме да тествате разрежданията на RT реакцията в PCR в реално време, за да проверите линейността на анализа. Това помага да се елиминират всякакви инхибиторни ефекти на RT реакционната смес, които могат да повлияят на точното количествено определяне на транскрипта.

3.1.5 Ефект на вторичната структура на РНК

Вторичната структура на РНК може да повлияе на RT-PCR по няколко начина. Регионите на РНК със сложна вторична структура могат да причинят спиране или дисоцииране на обратната транскриптаза от РНК матрицата (вижте фигурата Ефекти на сложната вторична структура върху RT-PCR: RT ефекти).

Скъсените сДНК, липсващи надолу по веригата място за свързване на праймера, след това не се амплифицират по време на PCR. Като алтернатива, обратната транскриптаза може да прескочи примкови региони на РНК, които след това се изключват от синтезираната кДНК. В етапа на PCR тези сДНК с вътрешни делеции се амплифицират и изглеждат като съкратени PCR продукти. В идеалния случай обратната транскриптаза не трябва да се влияе от вторичната структура на РНК и трябва да може да транскрибира обратно всеки шаблон, без необходимост от оптимизиране на реакцията.

При високо съдържание на GC тясната връзка на РНК:ДНК хибриди може да попречи на свързването на праймера по време на PCR и да попречи

на прогресирането на ДНК полимеразите (вижте фигурата Ефект на високо съдържание на GC върху RT-PCR: PCR ефекти). РНКаза H премахва РНК в РНК:ДНК хибриди, за да позволи праймерно свързване и синтез на втора верига на ДНК. По-рано беше показано, че смилането на RNase H подобрява добива на RT-PCR и е необходимо за амплификация на някои последователности, дори толкова къси, колкото 157 bp.

3.1.6 Ензими използвани за RT-PCR

RT-PCR позволява анализ на РНК с помощта на комбинация от обратна транскрипция и PCR. кДНК се синтезира от РНК шаблони с помощта на обратни транскриптази — РНК-зависими ДНК полимерази, обикновено изолирани от различни ретровирусни източници (напр. от птичи миелобластозен вирус [AMV] или вирус на миша левкемия на Moloney [MMLV]).

Въпреки че термостабилните ДНК полимерази като Tth ДНК полимераза също проявяват обратна транскриптазна активност при специфични условия, тези ензими не са толкова ефективни за обратна транскрипция, колкото мезофилните обратни транскриптази.

Едноверижната сДНК, получена чрез обратна транскрипция, е по-податлива на неспецифично отгряване на праймера при по-ниски температури, отколкото двойно-верижната ДНК (напр. геномна ДНК). Неспецифичното отгряване може да доведе до лоша специфичност на амплификацията, което, особено когато се комбинира с ограничаващо количество на сДНК или ниско изобилие на транскрипт, води до намалена чувствителност и лоша възпроизводимост. Специфичността на амплификацията е от решаващо значение за успешната RT-PCR и се постига най-добре чрез комбиниране на иновативни буферни разтвори със специално модифицирани обратни транскриптази и PCR с горещ старт.

3.1.7 Мултиплексен PCR и RT-PCR

При мултиплексна PCR в реално време няколко геномни ДНК цели се определят количествено едновременно в една и съща реакция. Мултиплексната RT-PCR в реално време е подобен метод, позволяващ едновременно количествено определяне на няколко РНК мишени в една и съща реакция. Процедурата може да се извърши или като двуетапна RT-PCR, или като едноетапна RT-PCR.

Мултиплексната PCR и RT-PCR предлагат много предимства за приложения като анализ на генна експресия, мониторинг на вирусния товар и генотипиране. Целевият(те) ген(и), както и вътрешната контрола се ко-амплифицирани в една и съща реакция, елиминирайки променливостта от ямка до ямка, която би възникнала, ако се извършат отделни реакции на амплификация. Вътрешният контрол може да бъде или ендогенен ген, който не варира в експресията между различните проби (напр. домакински ген; вижте таблицата Гени за домакинство, които обикновено се използват като ендогенни референции), или екзогенна нуклеинова киселина. За мониторинг на вирусния товар, използването на екзогенна нуклеинова киселина като вътрешен контрол позволява да бъдат проверени следните параметри: успехът на подготовката на пробата, липсата на инхибитори и успехът на PCR. Мултиплексният анализ осигурява висока прецизност при относителното количествено определяне на гена, където количеството на целевия ген се нормализира към количеството на контролния референтен ген. Количественото определяне на множество гени в една реакция също така намалява разходите за реагенти, запазва ценния материал на пробата и позволява увеличена производителност.

Мултиплексната PCR и RT-PCR стават възможни чрез използването на специфични за последователността сонди, всяка от които е белязана с отделно флуоресцентно багрило и подходяща гасителна част. Това означава,

че емисионните максимуми на багрилата трябва да бъдат ясно разделени и не трябва да се припокриват един с друг. В допълнение, реакциите трябва да се извършват на подходящ цикъл в реално време, който поддържа мултиплексен анализ (т.е. възбуждане и откриване на няколко незастъпващи се багрила в една и съща ямка или епруветка).

3.2 Тествани гени

Експресията на 84 отделни гена, важни за взаимодействието клетка-клетка и клетка-матрикс, беше измерена следвайки инструкциите на производителя.

Клетките бяха тествани за молекули на клетъчна адхезия и молекули на ECM.

3.2.1 Молекулите на клетъчната адхезия включват трансмембранни рецептори: ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4 (CD49D), ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, CD44, CDH1 (E-cadherin), HAS1, ICAM1, MMP14, MMP15, MMP16, NCAM1, PECAM1, SELE, SELL (LECAM-1), SELP, SGCE, SPG7, и VCAM1.

3.2.2. Клетъчно-клетъчни адхезионни гени: CD44, CDH1 (E-cadherin), COL11A1, COL14A1, COL6A2, CTNND1, ICAM1, ITGA8, и VCAM1.

3.2.3 Клетъчно-извънклетъчна матрична адхезия: ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4 (CD49D), ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGAL, ADAMTS13, CD44, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, SGCE, SPP1, и THBS3.

3.2.4 Други клетъчно адхезионни молекули: ANOS1, CCN2, CLEC3B, CNTN1, COL12A1, COL15A1, COL16A1, COL5A1, COL6A1, COL7A1, COL8A1, CTNNA1, CTNNB1, CTNND2, FN1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMB1, LAMB3, LAMC1, THBS1 (TSP-1), THBS2, TNC, VCAN, VTN.

3.2.5 ECM молекулите включват компоненти на базалната мембрана: COL4A2, COL7A1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMB1, LAMB3, LAMC1 и SPARC.

3.2.6 Колагени и структурни съставки на ECM: COL1A1, COL4A2, COL5A1, COL6A1, COL6A2, COL7A1, COL8A1, COL11A1, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, ANOS1 и FN1.

3.2.7 Протеази ECM: ADAMTS1, ADAMTS13, ADAMTS8, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, SPG7, и TIMP1.

3.2.8 Протеазни инхибитори ECM : ANOS1, COL7A1, THBS1 (TSP-1), TIMP1, TIMP2, и TIMP3.

3.2.9 Други ECM молекули: CCN2, CLEC3B, ECM1, HAS1, SPP1, TGF-b1, THBS2, THBS3, TNC, VCAN, и VTN.

3.3 Адипогенна, хондрогенна и остеогенна in vitro диференциация

Всички клетъчни култури са подложени на адипогенни, хондрогенни и остеогенни пътища на диференциация чрез добре установени методологии. Започвайки с началния етап на засяване, клетките, представляващи шестте различни типа, бяха разпределени в 6-ямкови плаки с изчислена плътност от 5000 клетки/cm2, с цел равномерно разпределение и прикрепване на клетките. С напредването на културите, достигайки критичен праг от 70% до 80% сливане, настъпи основен преход. В този момент стандартната среда за клетъчна култура беше заменена със специализирана среда за диференциация, съобразена с нуждите на всяка специфична линия и сигналите за развитие.

Формулировката на остеогенната среда се състои от 10 mM β-глицерофосфат, 100 nM дексаметазон и 50 mM аскорбинова киселина, подхранващи образуването на костна тъкан.

Адипогенната среда се състои от разтвор, включващ 50 mM дексаметазон, 500 nM изобутил метил ксантин и 1 mg/mL инсулин, чиято цел е да предизвика сложната каскада от събития, водещи до диференциация на адипоцитите.

Хондрогенната среда включва 100 nM дексаметазон, 100 mM аскорбинова киселина и 5 ng/mL трансформиращ растежен фактор-b1 (TGF-b1) за диференциация на хондроцитите. Тази комбинация от растежни фактори и химични индуктори има за цел да имитира физиологичната микросреда, благоприятна за хондрогенна диференциация.

След въвеждането на тези специализирани среди, клетките бяха инкубирани с тях в продължение на десет дни, през които диференциационните среди бяха усърдно подменяни на всеки втори или трети ден, за да се поддържат оптимални условия за обвързване на линията. След завършване на този инкубационен период, културите се подлагат на фиксиране с помощта на 4% параформалдехид за 20 минути, последвано от щателна стъпка на изплакване с 1X PBS, за да се подготвят за последващи процедури на оцветяване.

Освен това, пробите бяха оцветени с Alizarin red S, Alcian blue и маслено червено O, всяка избрана за селективно подчертаване на различни маркери на остеогенна, хондрогенна и адипогенна диференциация, съответно. Този процес на оцветяване, извършен в продължение на 10 до 20 минути при стайна температура, улеснява визуализацията и количественото определяне на специфични за линията маркери в култивираните клетки.

Накрая, излишното багрило беше отстранено чрез серия от нежни измивания с 1X PBS, гарантирайки запазването на клетъчната цялост и точното тълкуване на резултатите от оцветяването. Диференцираните клетки, сега подготвени за оценка, бяха проверени с помощта на фазово-контрастна микроскопия, което позволява подробно изследване и качествена оценка на техния ангажимент по линия и статус на диференциация.

3.4 Статистически анализ

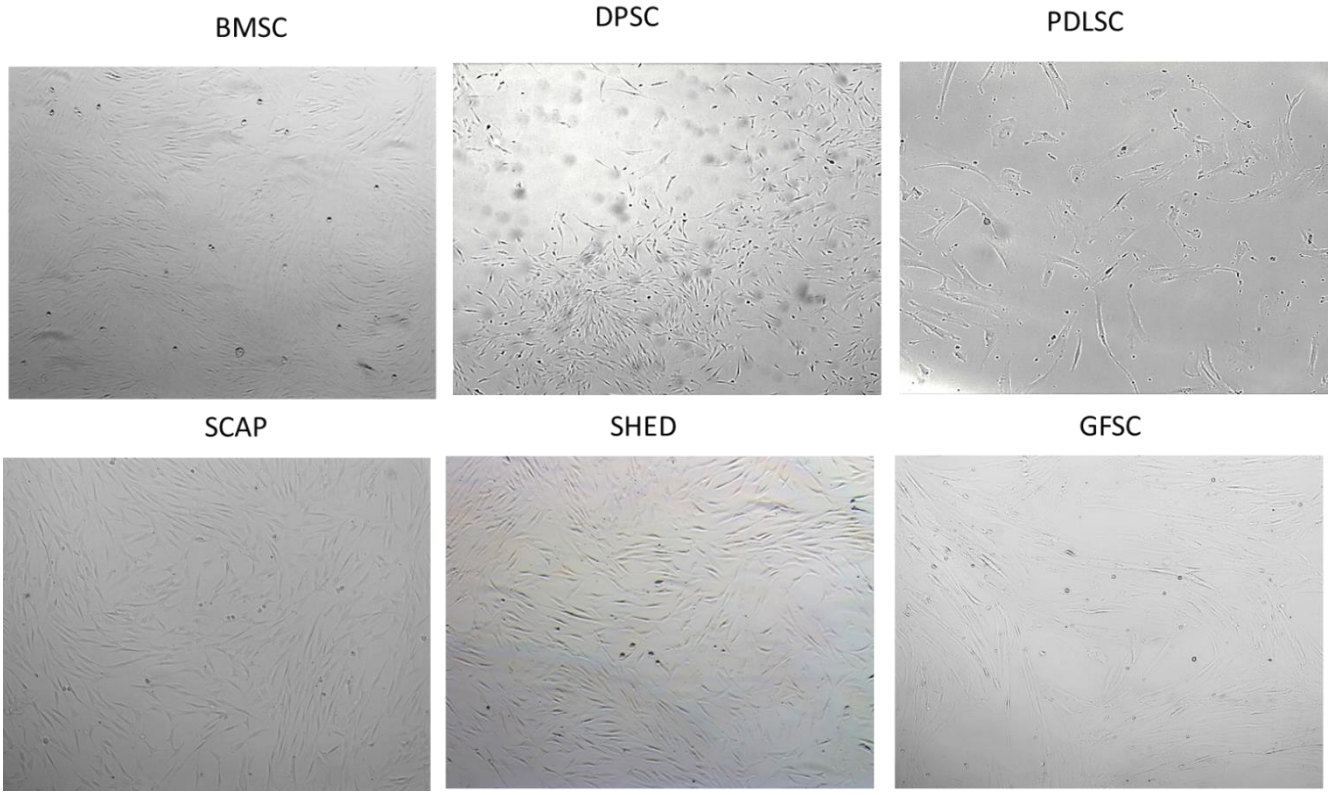
Праговият цикъл (Ct) за всяка ямка се определя от софтуер за цикъл в реално време. Разликите в статистическата значимост в средните стойности на Ct бяха определени с RT2 Profiler PCR Array Data Analysis Software (Центърът за анализ на данни GeneGlobe, достъпен в публичното пространство на https://geneglobe.qiagen.com/bg/analyze). Разликата се счита за значителна (P <.05) и по-голяма от 2,0-кратна промяна. Референтни гени за нормализиране на RT-PCR данни бяха GAPDH и b-2 микроглобулин (B2M). За клетъчен анализ с високо съдържание, данните за общ брой около 10 000 клетки бяха анализирани с помощта на SigmaPlot 13.0 (Systs Software Inc.). Флуоресцентната фракция, определена чрез разделяне на цитозолната флуоресценция с фоновата флуоресценция, беше използвана във всички анализи. Неоцветените клетки бяха сравнени с оцветените клетки с помощта на теста Mann-Whitney U (непараметричен, несдвоен) и P <.05 се счита за статистически значимо. За преброяване на клетки, анализът на дисперсията (ANOVA), последван от пост-хок анализ на Bonferroni с < 0,05 като значим, беше извършен с помощта на IBM SPSS 23 (SPSS Inc.).

4. Резултати

Шест типа OCSC (орални стволови клетки) бяха успешно изолирани и култивирани при стандартни условия за клетъчно култивиране.

Изолираните клетки се характеризираха с фибробластоподобна форма , характерна за мезенхимните стволови клетки: . При стандартно култивиране, клетките достигнаха 80% до 90% конфлуентност за период от 7 до 10 дни (фигура 3). Всички шест типа клетки бяха успешно култивирани до пети пасаж, като запазиха своите морфологични и функционални характеристики.

Процесът на изолиране и култивиране беше внимателно наблюдаван, като се обръщаше внимание на ключовите параметри на растеж и развитие на клетките. Важно беше да се поддържат оптимални условия за култивиране, включително подходяща среда, температура и влажност, за да се осигури стабилен растеж и размножаване на клетките. При всеки пасаж се проверяваха жизнеността и морфологията на клетките, за да се гарантира, че те остават в състояние, подходящо за бъдещи изследвания и приложения.



Фигура 3. Изолирани стволови клетки, заснети на светлинен микроскопо. Увеличение x20.

4.1 Имунофлуоресценция

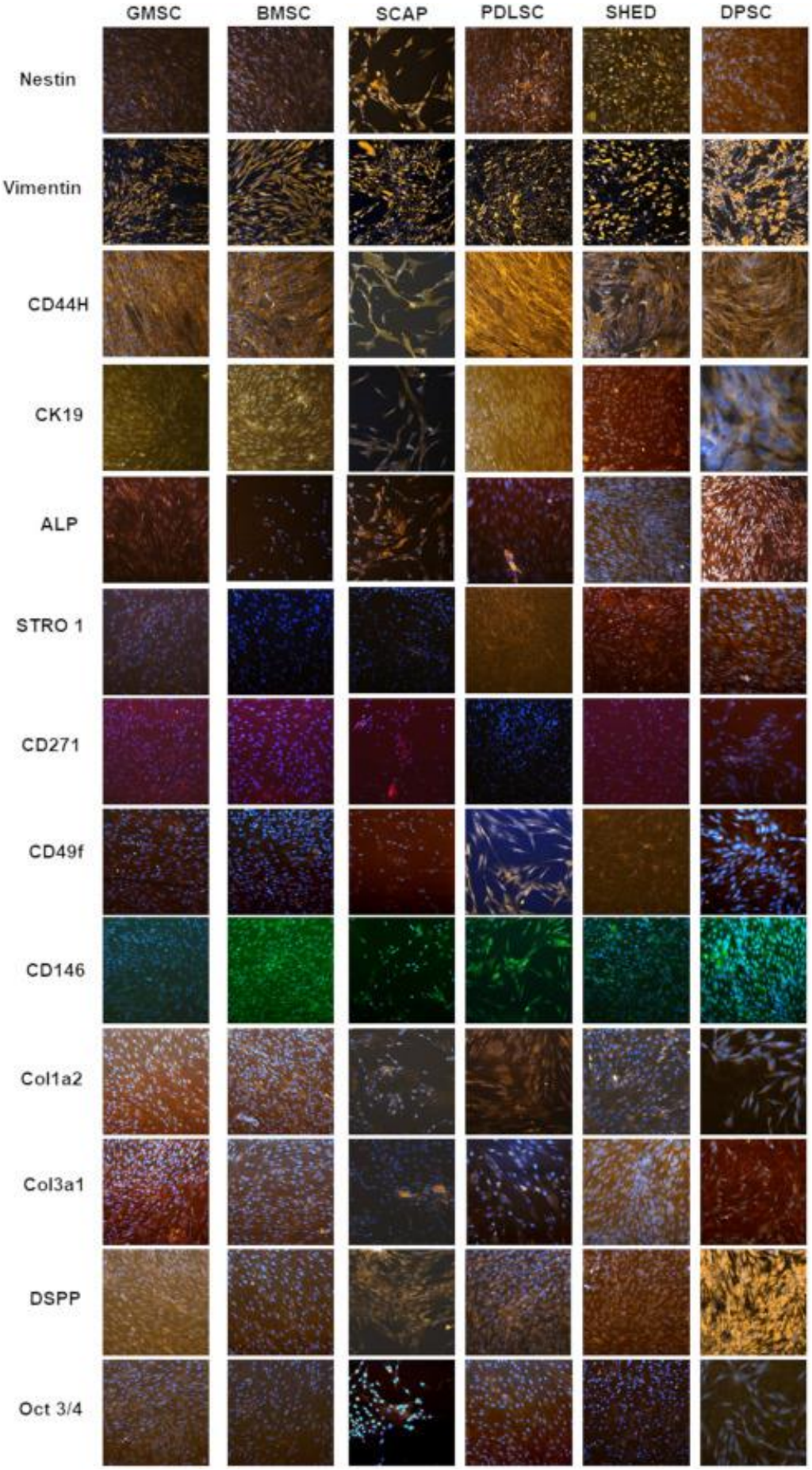
След изолирането и култивирането на хетерогенните клетъчни култури, те бяха подложени на задълбочен имунофлуоресцентен анализ, за да се определи експресията на различни вътреклетъчни и клетъчно повърхностни маркери. Този качествен анализ разкри постоянната експресия на маркери, характерни за мезенхимни стволови клетки, като нестин, виментин, CD44H, CK19, ALP, STRO1, CD271, CD49f, CD146 и Oct 3/4.

Освен това, бяха идентифицирани специфични маркери за диференциация, като Col1a2, Col3a1 и DSPP, които са тясно свързани със зъбните тъкани. Това откритие подчертава потенциала на тези клетки за приложения в денталната регенеративна медицина. Визуалното представяне на резултатите от имунофлуоресцентния анализ е показано на Фигура 4, където ясно се вижда експресията на споменатите маркери.

Имунофлуоресцентният анализ беше проведен с голяма прецизност, използвайки антитела, специфични за всеки от маркерите. Това позволи точното локализиране и идентифициране на маркерите в клетките. Резултатите потвърждават високата степен на хетерогенност и потенциала за мултипотентност на култивираните клетки, като предоставят важна информация за бъдещото им използване в различни терапевтични приложения.

Въз основа на тази качествена оценка беше предприето по-подробно изследване с помощта на високопроизводителни имунофлуоресцентни

техники. Този подход позволи полуколичествен анализ на нивата на експресия на маркери в различните типове клетки. Резултатите разкриват специфични вариации в профилите на експресия на маркерите на мезенхимни стволови клетки сред тестваните популации.



Фигура 4. Характеристика на мезенхимни стволови клетки от орален произход.

Конфокални микроскопски снимки с различни поръхности имунофлуоресцентни маркери експресиращи се от BMSC - Мезенхимните стволови клетки от костен мозък, DPSC - Стволови клетки от зъбна пулпа, SHED - Стволови клетки от пулпа на временни зъби, PDLSC - Стволови клетки от пародонтален лигамент, SCAP - Стволови клетки от апикалната папила, GMSC - Гингивални мезенхимни стволови клетки. Увеличение x20.

Трябва да се отбележи, че виментинът беше равномерно експресиран във всички типове клетки. Експресията на CD44 беше широко разпространена във всички типове клетки, с изключение на SCAP.

Различните типове клетки показаха специфични модели на експресия на определени маркери. DPSC, SCAP, PDLSC и SHED показаха повишени нива на CD146, CD271, CD49f, Oct 3/4 и Sox 9.

Наблюдава се4 повишена експресия на CD271 в PDLSC и високи нива на CD49f в SCAP. Също така, високата експресия на CD146 и Sox 9 в DPSC илюстрира специфичните им роли и потенциални функции.

Експресията на Oct 3/4 беше преобладаваща във всички групи, с изключение на GMSC. Интересно е да се отбележи, че FGF7 има висока експресия експресия единствено в PDLSC, което може да е индикатор за специализирани функции на тези клетки. Nestin е/беше открит както в PDLSC, така и в DPSC, докато BMP4 показваше преобладаваща експресия в SCAP, макар и в по-малка степен в DPSC, отразявайки разнообразието в регулаторните механизми и функционалните потенциали на тези клетки.

Този подробен полуколичествен анализ предоставя ценна информация за специфичните характеристики и потенциала на различните популации стволови клетки. Тези резултати също така демонстрират значението на използването на високопроизводителни техники за по-добро разбиране на биологичните свойства и потенциала на различните типове стволови клетки. Таблица 2.

Процент на експресия на маркерите в стволови клетки от орален произход						
%	BMSC	GMSC	SHED	PDL	DPSC	SCAP
Vimentin	85.14	83.97	91.75	87.92	91.97	92.56
CD44	33.40	16.67	57.10	56.66	18.67	0.50
CD71	30.78	21.16	26.95	41.46	31.95	33.90
Collagen 3	42.93	45.45	38.13	21.31	26.33	32.22
CD90	37.37	4.70	28.07	35.47	42.05	40.14
Collagen 1	15.41	43.74	35.14	26.91	23.45	18.57
CD49F	12.02	12.90	21.51	33.21	32.96	41.56
CD146	15.76	18.62	23.07	27.96	47.65	25.43
CD271	19.17	19.27	21.36	40.26	29.94	37.85
Oct3/4	11.44	5.49	22.33	31.09	33.79	21.51
Sox9	7.02	5.78	27.98	37.07	38.56	25.51
ALP	10.59	2.93	8.98	12.58	22.68	22.65
Nestin	11.09	7.12	11.18	26.54	25.94	12.13
FGF7	8.72	11.03	18.97	20.23	19.87	15.95
CD117	17.86	13.96	5.19	14.83	12.16	12.77
BMP4	5.80	4.70	6.67	8.93	19.91	21.68

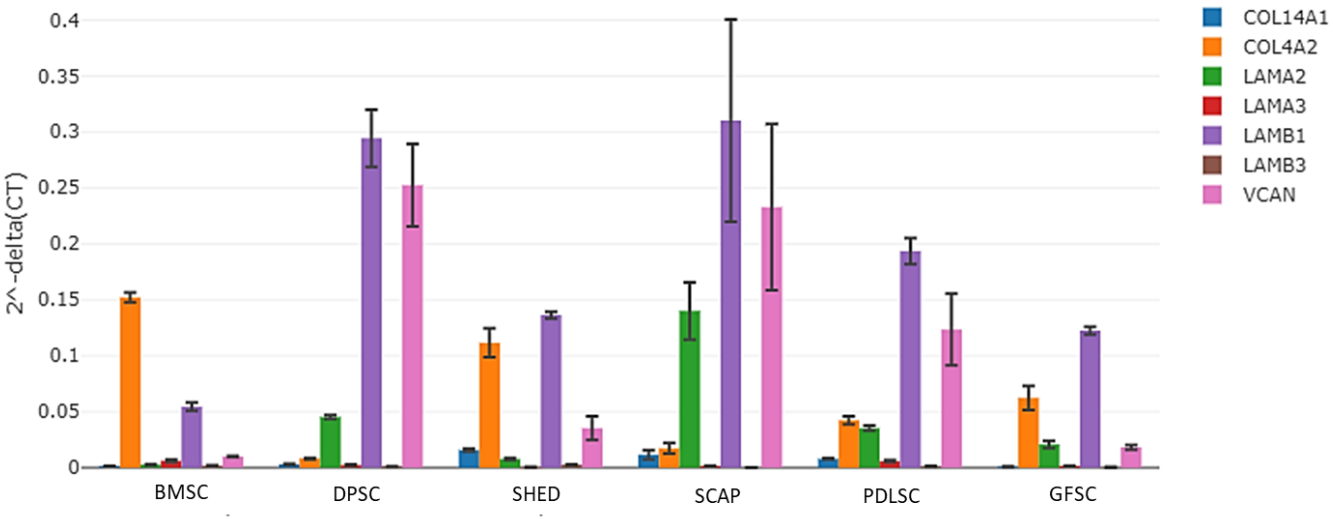
Таблица 2. Процентна експресия на маркери в стволови клетки от орален произход. *Червено - cell count >10<20% ; Оранжево – cell count >20<50%; Зелено - cell count above 50%.* BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа на временни зъби,* PDLSC - *Стволови клетки от пародонтален лигамент,* SCAP - *Стволови клетки от апикалната папила,* GMSC - *Гингивални мезенхимни стволови клетки*

4.2 RT-PCR

В нашето проучване проведохме обширен анализ на шест различни клетъчни групи, като всяка от тях беше оценена за експресията на 84 специфични гена. Контролната група беше BMSC (костномозъчни

мезенхимни стволови клетки). Сред изследваните гени, значителна свръхекспресия на LAMA2 и LAMB1 беше наблюдавана в OCSC (орални стволови клетки) в сравнение с BMSC, докато ITGA7 експресията беше значително понижена. Гените бяха групирани в шест функционални групи.

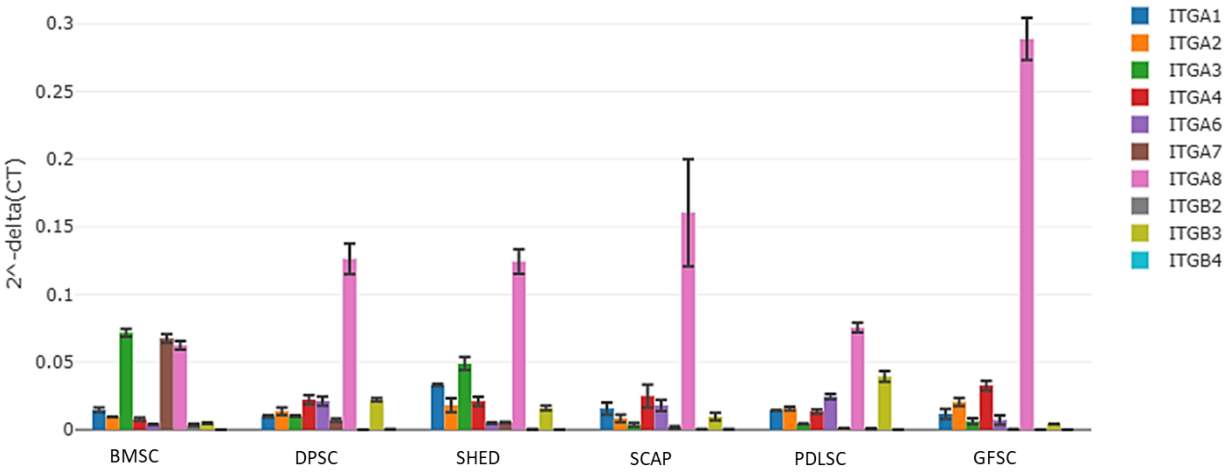
1. *Молекулите на клетъчната адхезия включват трансмембранни рецептори*



Фигура 5. Експресия на гените за молекулите на клетъчна адхезия включващи трансмембранни рецептори. BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа на временни зъби,* PDLSC - *Стволови клетки от пародонтален лигамент,* SCAP - *Стволови клетки от апикалната папила*, GMSC - *Гингивални мезенхимни стволови клетки*

На фигура 5 е представена LAMA2, LAMB1, VCAN и COL14A1 с повишена експресия в DPSC, SCAP, SHED и GMSC спрямо контролата. DPSC има понижена експресия на COL4A. SHED има понижена експресия на LAMA3, а SCAP на LAMB3.

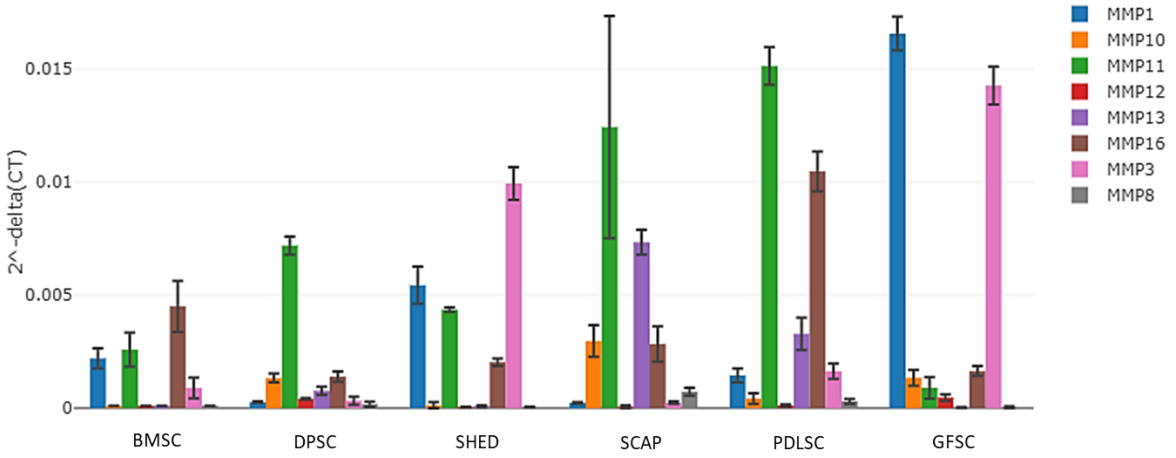
2. *Клетъчно-клетъчни адхезионни гени и интегрини*



Фигура 6. Екпресия на клетъчно-клетъчните адхезионни гени и интегрини. BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа на временни зъби,* PDLSC - *Стволови клетки от пародонтален лигамент,* SCAP - *Стволови клетки от апикалната папила,* GMSC - *Гингивални мезенхимни стволови клетки*

DPSC има повишена експресия на ITGA4, ITGA6, ITGB3,ITGB1 and ITGA8 спрямо контролата. SHED има повишена експресия ITGA4, ITGB3, ITGB1 and ITGA1, както епоказано на фигура 6. SCAP има повишена експресия на ITGA4, ITGA6, ITGB4, ITGB1 и ITGA8. PDLSC има повишена експресия на ITGA6, ITGB1 и ITGB3. GMSC има висока експресия ITGA4, ITGA8, ITGB1 и ITGA2. При всички тествани групи се наблюдава понижена експресия на ITGA7. ITGA3 е с понижена експресия при SCAP, PDLSC, GMSC. Също така ITGB2 е с понижена експресия при GMSC.

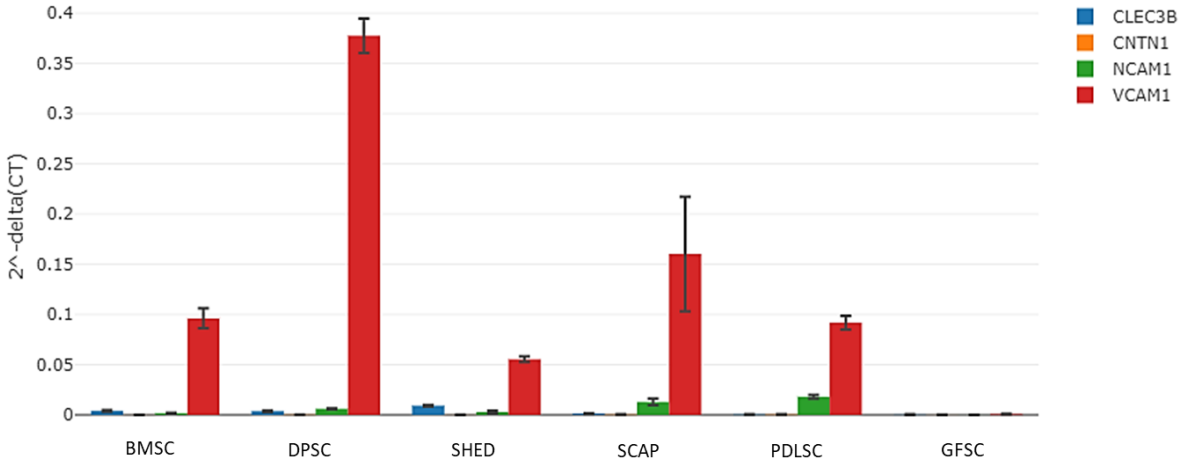
3. *Матриксни металопротеинази (MMP) и тъканни инхибитори на металопроеинази (TIMPs)*



Фигура 7. Експресия на матриксни металопротеинази (MMP) и тъканни инхибитори на металопротеинази (TIMPs); BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа на временни зъби,* PDLSC - *Стволови клетки от пародонтален лигамент,* SCAP - *Стволови клетки от апикалната папила*, GMSC - *Гингивални мезенхимни стволови клетки*

На фигура 7 се наблюдава MMP10, MMP11, MMP12, и MMP13 са с висока експресия при DPSC. MMP1 иMMP3 са с висока експресия при SHED, докато TIMP1 е с понижена експресия при тях. MMP8, MMP10, MMP11 и MMP13 са с висока експресия при SCAP. MMP8, MMP11, MMP13, и MMP16 се проявяват с висока експресия в PDLSC. MMP1, MMP3, MMP10, и MMP11 са с висока експресия при GMSC.

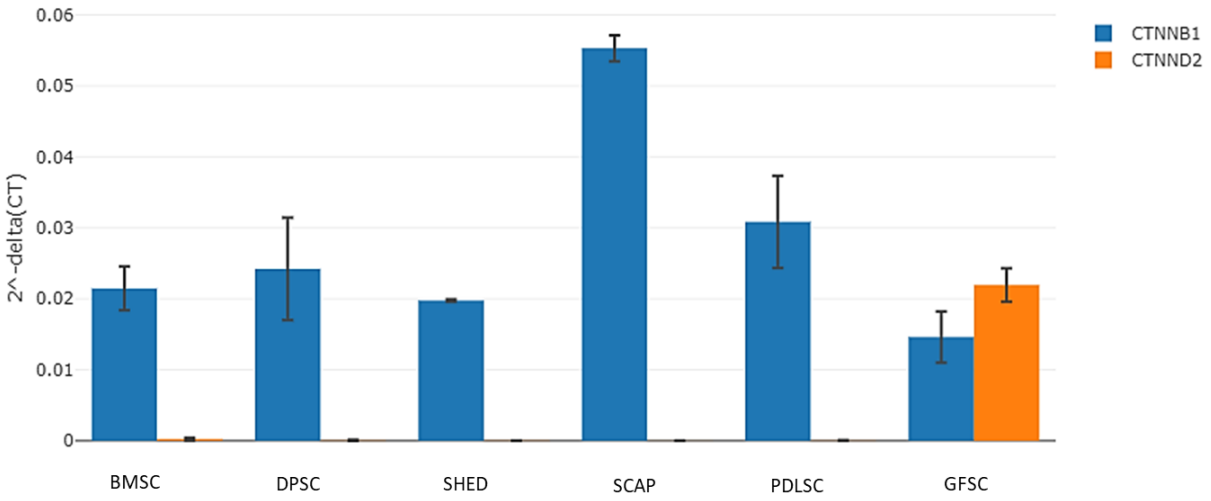
4. *Клетъчни адхезивни молекули участващи при директни клетъчни контакти*



Фигура 8. Експресия на клетъчни адхезивни молекули участващи при директни клетъчни контакти; BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа на временни зъби,* PDLSC - *Стволови клетки от пародонтален лигамент,* SCAP - *Стволови клетки от апикалната папила*, GMSC - *Гингивални мезенхимни стволови клетки*

На фигура 8 е представена висока експресия на CNTN1, NCAM1 и VCAM1 в DPSC. SHED са единствената група клетки, които проявяват висока експресия на гените CLEC3B, както и CNTN1 и VCAM1. При PDLSC се наблюдава висока експресия на CNTN1, VCAM1 и NCAM1 . Същите са с понижена експресия и при GMSC

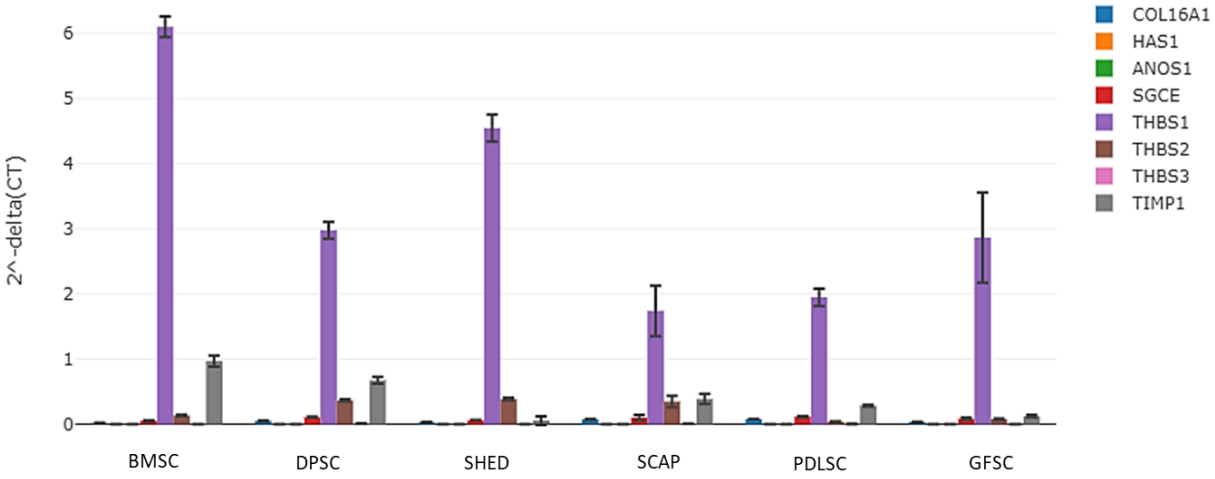
5. *Клетъчна сигнализация и трансдукционни гени*



Фигура 9. Експресия на клетъчна сигнализация и трансдукционни гени ; BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа на временни зъби,* PDLSC - *Стволови клетки от пародонтален лигамент,* SCAP - *Стволови клетки от апикалната папила*, GMSC - *Гингивални мезенхимни стволови клетки*

Всички клетки експресират CTNNB1 както е показано на фигура 9, като SCAP е с най-висока експресия. Докато CTNND2 се експресира само от GMSC.

6. *Други ECM молекули*

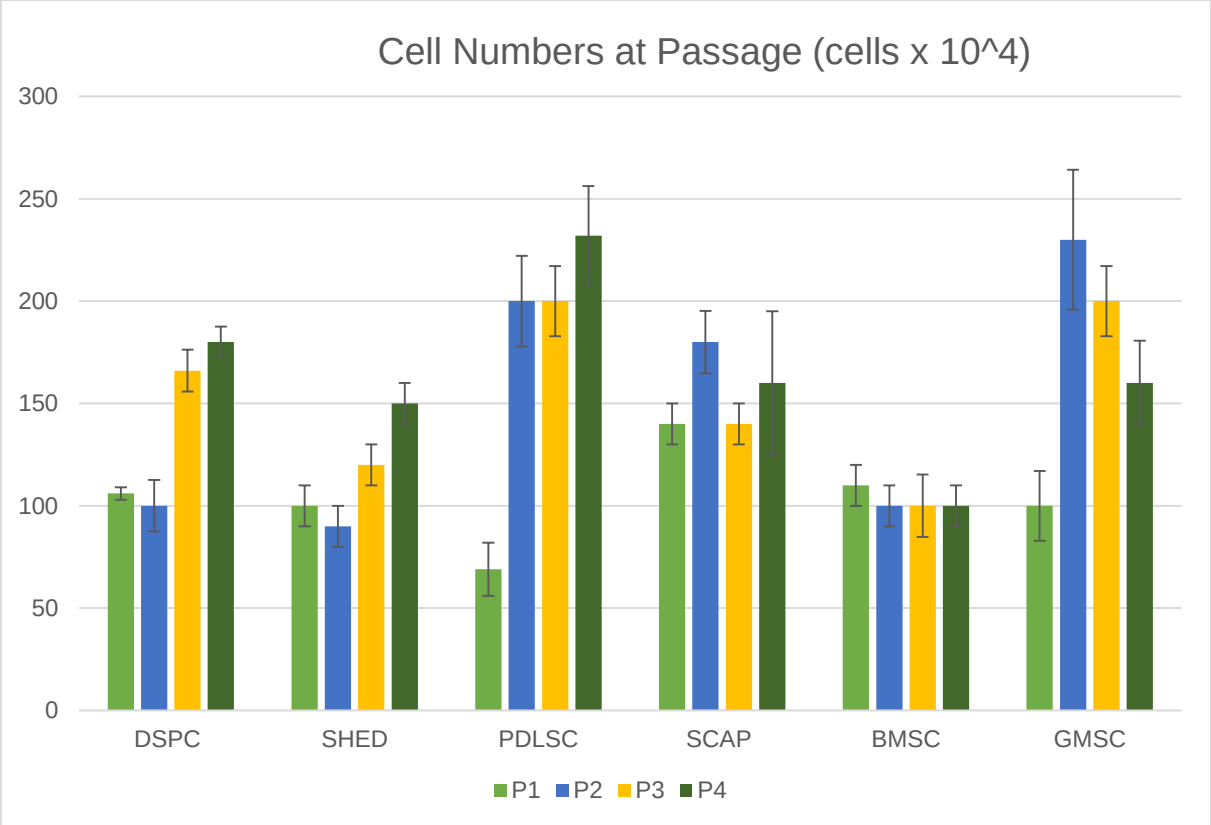


Фигура 10. Експресия на други ECM молекули; BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа на временни зъби,* PDLSC - *Стволови клетки от пародонтален лигамент,* SCAP - *Стволови клетки от апикалната папила*, GMSC - *Гингивални мезенхимни стволови клетки*

На фигура 10 са представени COL16A1, THBS2, THBS3, и SGCE са с висока експресия в DPSC. SHED има висока експресия само в THBS2 и много ниска експресия в гените HAS1 и TIMP1. COL16A1, THBS2 и THBS3 са с висока експресия в SCAP. COL16A1 и SGCE са с висока ескпресия в PDLSC, докато HAS1 е с ниска експресия при тези клетки. THNS1 е с висока експресия при GMSC. При тях се наблюдава понижена експресия на TGF-β1, HAS1, и ANOS1

4.3 Пролиферативен профил

Всички клетки в проучването проявяват сходни профили на пролиферация, които обикновено са по-високи в сравнение с клетките от контролната група BMSC. DPSC, SHED и PDLSC демонстрират нарастващ профил на пролиферация, като достигат пик при четвъртия пасаж както е показано на Фигура 11. Този ръст в пролиферацията може да отразява тяхната способност за самообновление и бързо размножение, което е от значение за тяхната роля в тъканната регенерация и лечението на различни патологии.



Фигура 11. Клетъчно броене на клетки от BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа на временни зъби,* PDLSC - *Стволови клетки от пародонтален*

лигамент, SCAP - *Стволови клетки от апикалната папила*, GMSC - *Гингивални мезенхимни стволови клетки* между 1ви и 4ти пасаж.

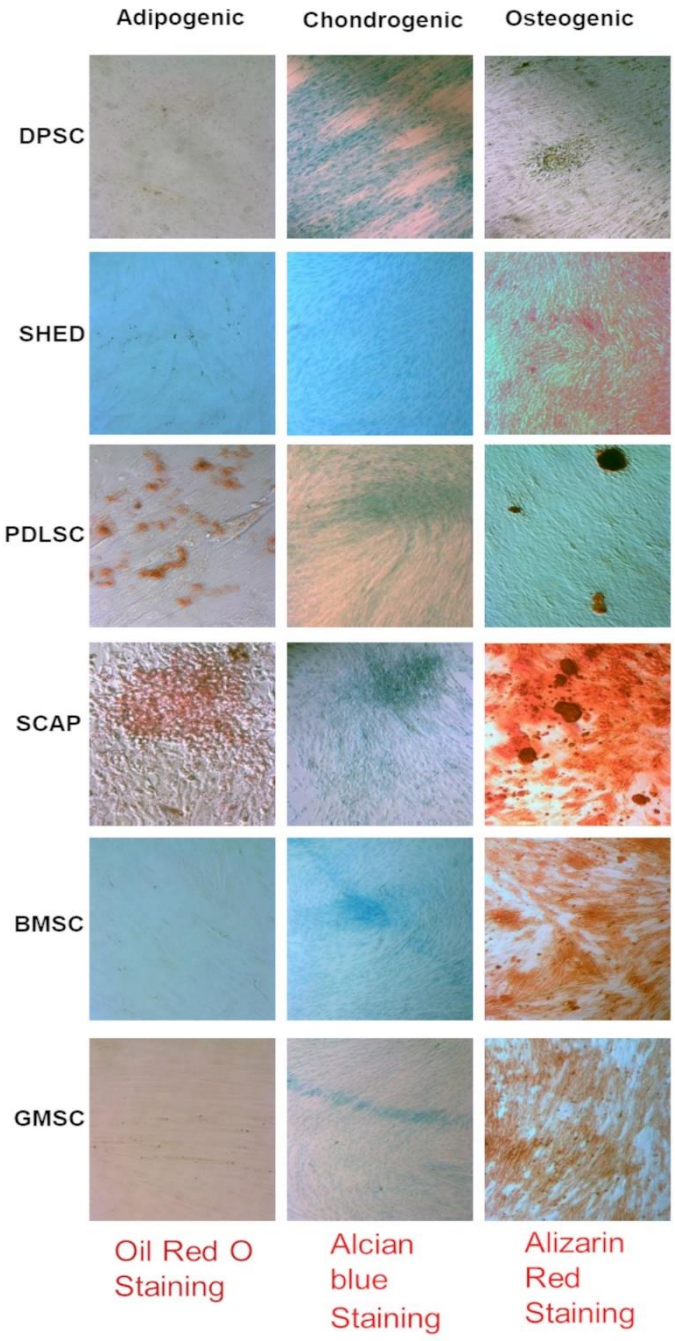
От друга страна, SCAP и GMSC проявяват най-висок пролиферативен капацитет в ранните пасажи, като достигат върха си във втория пасаж. Този резултат може да бъде свързан с техните особени характеристики и произход от различни тъкани, което може да има влияние върху тяхната скорост на пролиферация и потенциала им за клетъчно размножаване.

В сравнение с това, BMSC продължават да проявяват стабилна пролиферация през всички пасажи, като това може да отразява тяхната стабилност и добра реакция на клетъчните култури.

Статистическият анализ, извършен с помощта на ANOVA (анализ на дисперсията), показва статистически значими разлики между всички групи. Това подчертава важността на клетъчния профил на пролиферацията и разнообразието от клетъчни отговори в зависимост от техния произход и характеристики. Тези наблюдения предоставят ценна информация за разбирането на биологичните особености на различните клетъчни типове и тяхната потенциална приложимост в медицинската практика. ($P < .05$; Фигура 11).

4.4 Потенциал за многолинейна диференциация

За да разширим нашето изследване на свойствата на стволовите клетки, които сме изолирали, извършихме оценка на тяхната способност за многолинейна диференциация. Всички изследвани клетки от устната кавита преминаха през специфични процеси на диференциация. Фигура 12 представя подробно състоянието на клетките след 10-дневно култивиране в специално разработена среда с добавени активни съставки.



Фигура 12.
Alizarin red оцветяване, след 10 дневна остеогенна диференциация;
Alcian blue оцветяване след 10 дневна хондрогенна диференциация;
Oil Red O оцветяване след 10 дневна адипоцитна диференциация на клетки от
- Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,

- Стволови клетки от зъбна пулпа,
- Стволови клетки от пулпа на временни зъби,
- Стволови клетки от пародонтален лигамент,
- Стволови клетки от апикалната папила,
- Гингивални мезенхимни стволови клетки;

Въпреки че всички клетки се диференцираха, забелязахме различия в тяхната готовност за конкретни видове диференциация. Например, способността за остеогенна диференциация беше потвърдена с оцветяване на клетките с Alizarin Red S след 10 дни. SCAP и BMSC показаха най-голям потенциал за образуване на калциеви възли, последвани от GMSC. DPSC и

SHED също демонстрираха способности за остеогенна диференциация, но в по-малка степен. В PDLSC културите способността за образуване на калциеви възли беше ограничена до едноклетъчни клъстери.

Също така, клетки, подложени на адипогенна клетъчна диференциация, претърпяха промени в клетъчната си форма и образуваха вътреклетъчни липидни вакуоли, които бяха положително оцветени с маслено червено О. Най-силна адипоцитна клетъчна индукция беше забелязана в културите на PDLSC и SCAP.

Хондрогенната клетъчна диференциация беше оценена с помощта на оцветяване с Alcian Blue след 10 дни. Всички клетки показаха способност да се диференцират в клетки, подобни на хондробласти, въпреки че културите на SHED претърпяха хондрогенна диференциация в по-малка степен.

Тези наблюдения предоставят допълнително разбиране за потенциала на стволовите клетки от устната кавита за клетъчна регенерация и тяхната приложимост в различни аспекти на медицинската практика.

5. Дискусия

През последните десетилетия има нарастващ интерес към OCSCs поради лесния достъп до структурите, от които се изолират и характерните стволовоклетъчни свойства, които е установено, че притежават. Все още обаче липсват изчерпателни литературни научни данни, описващи свойствата на всички стволови клетки, получени от устната кухина. MSC, получени от зъбни тъкани, често са недостатъчно характеризирани, сравнени и описани. Обикновено учените ги сравняват с добре проучени стволови клетки като BMSCs. За значителен период от време беше широко разпространено мнението, че клетките от устната кухина наподпобяват и дори представляват фибробласти клетките бяха характеризирани за

експресия на мезенхимни маркери, пролиферативен и диференциационен капацитет, но без да се характеризират за диференциационни маркери. Независимо че в момента фибробластната теория е отхвърлена, има много малко доклади които сравняват пълния спектър на различните стволови клетки от орален произход. По-чести проучвания са насочени към сравняване на отделни видове клетки помежду им и ключовите им ствойства, като например: Yang et al сравняват GMSC със зъбния фоликул и Qu et al показват разликата между DPSC и PDLSC, както и BMSC и типовете клетки на зъбния фоликул . В нашите настоящи условия на in vitro култура, които включват наличието на FBS, MSC демонстрират сравним потенциал за растеж, съответстващ на литературните данни. Нашата основна цел беше да проведем цялостна характеристика на тези стволови клетки, за да подобрим разбирането си за техните функции и свойства като стволови клетки. Обикновено изследванията сравняват свойствата на до 3 вида стволови клетки от устната кухина. Въпреки това, по време на нашето изследване и наблюдение на всички OCSC и различните протоколи, използвани за тяхното изолиране и диференциране, ние разкрихме както незначителни, така и големи разлики между всичките 6 от тях. В настоящото ни изследване нашият фокус беше върху изолирането и изследването на DPSC, SCAP, SHED, PDLSC и GMSC. Използвахме BMSC като контролни групи във всеки експеримент, следвайки предишна работа. Чрез разкриване и сравняване на свойствата на всички изолирани типове клетки, ние се стремим да предоставя изчерпателна информация и насоки за потенци ални клинични приложения.

5.1. Стволови клетки и диференциационни маркери

Настоящото проучване използва широка гама от маркери за пълно характеризиране на изолирани OCSC. Някои маркери са свързани със свойствата на стволовите клетки, докато други са свързани със специфични

биологични функции. Разнообразната маркерна експресия сред изолираните типове клетки потвърди тяхната способност за многолинейна диференциация и разкри вариации в свойствата на стволовите клетки. Виментин, добре известен MSC маркер, показва висока експресия в хетерогенните култури, в съответствие с предишни доклади. Виментин е междинна нишка тип III, отговорна за поддържането на клетъчната форма, вътреклетъчния транспорт на молекули, клетъчната подвижност, фокалните адхезии и т.н. На. Доказано е, че засилва активирането на интегрин и рецептора за хиалуронова киселина (CD44), като го свързва директно. CD44, мезенхимен маркер, който е от решаващо значение за адхезията в хиалуроновата матрица, също е свързан с епителен-мезенхимния преход. Той е силно експресиран в GMSC , SHED и PDLSC, но не и в SCAP. SHED и PDLSC показват повишена експресия на CD44, вероятно свързана с ролята им в оралната микросреда, т.е. свързване и ремоделиране на екстрацелуларни фибриларни структури в процесите на структурна корекция на периодонталния лигамент и резорбция на зъбния корен . Заедно с високата експресия на виментин, експресията на CD44 може да означава по-голям брой недиференцирани мезенхимни клетки в хетерогенните SHED и PDLSC култури. Това може да е свързано със синтеза на пародонтални влакна и противодействие на дъвкателните сили, както и за SHED дентална резорбция и ексфолиация и пробив на постоянни зъби; ALP представлява група от протеини, критични в процеса на минерализация на скелета. Като се има предвид, че ектомезенхимните стволови клетки присъстват както в костните, така и в ембрионалните зъбни структури, се очаква, че тези клетки, изолирани от не напълно развити трети молари, ще експресират ALP до известна степен . Данните, представени в таблицата, показват, че DPSC и SCAP показват най-високата експресия на ALP, следвани от PDLSC и BMC, докато GMSC и SHED демонстрират най-ниската експресия на този маркер. Повишената експресия на ALP в DPSC и SCAP вероятно е свързана с

тяхното участие в процесите на минерализация. Всички тествани маркери в това проучване показват сходна експресия в контролните групи, BMSCs и GMSCs, с висока експресия на виментин и значителна експресия на CD71 и колаген 3. Колаген 3 обикновено се свързва с колаген 1 и играе значителна роля в развитието на съединителната тъкан. Освен това, нашите данни показват разлики в експресията на CD49f, CD146, CD271, CD117, BMP4, Sox 9, Oct 3/4, nestin и FGF7 сред клетъчните типове. Тези вариации се дължат на техния ембриологичен произход и тъканно-специфични функции. CD49F (интегрин a6) се експресира в различни тъкани и се свързва с пролиферацията на стволови клетки, включително ракови стволови клетки, докато CD146/MCAM играе решаваща роля в остеогенната диференциация и образуването на кост. CD271 е специфичен маркер за характеризиране и пречистване на човешки MSCs на костен мозък и CD117 се счита за маркер за ангиогенни стволови клетки, експресиран от всички наши клетъчни типове в различна степен. Sox 9, транскрипционен фактор, експресиран по време на хондрогенезата, поддържа своята експресия при възрастни, без да се ограничава до ембрионалното развитие. Oct 3/4 е друг маркер на стволови клетки, свързан с ранното клетъчно развитие и плурипотентните характеристики. Nestin регулира производството на междинен филаментен протеин и влияе върху деленето на прогениторни клетки, особено в нервните прогениторни клетки. BMP4 е отговорен за ангиогенезата и тъканната минерализация, влияейки върху различни клетъчни функции. FGF7, растежен фактор на фибробластите, засяга предимно мезенхимната клетъчна пролиферация, миграция и диференциация. Нашите открития разкриха значителни вариации в експресията на маркер сред различните типове клетки. CD146, CD271, CD49f, Oct 3/4 и Sox 9 показват по-високи нива в DPSC, SCAP, PDLSC и SHED. Трябва да се отбележи, че PDLSC показа най-високата експресия на CD271, надминавайки тази на BMSCs. SCAP показа повишени нива на

CD49f, които са от решаващо значение за остеогенната диференциация, докато DPSC увеличи експресията на CD146 и Sox 9, свързана с ембрионалното развитие и плурипотентността. Oct 3/4 имаше значителна експресия във всички групи с изключение на BMSCs, което показва ролята му в ранното клетъчно развитие и плурипотентност, в съответствие с предишни проучвания. Освен това, ние открихме уникален модел на експресия на FGF7, изключителен за PDLSC, което предполага неговата роля в микросредата на пародонталния лигамент, потенциално поддържащи клетки, обърнати към оклузия сили и фактори на околната среда. Nestin присъства както в PDLSC, така и в DPSC, докато BMP4 се експресира предимно в SCAP. Всички типове клетки показаха различни и различни профили на експресия, предлагащи представа за разнообразните свойства на изолираните стволови клетки от устната кухина.

5.2 Анализ на генна експресия

ECM е динамична система от извънклетъчни протеини, гликопротеини и полизахариди, осигуряваща целостта и структурата на тъканите и предоставяйки на клетките подходящо скеле за тяхната функция. Ремоделирането на ECM е свързано с растеж, възстановяване на тъкани, онкогенеза и инвазия, модулиране на имунните реакции и възпаление. Изолираните клетки от възрастен организъм за изследователски цели обикновено са хетерогенни клетъчни култури. Това разнообразие и хетерогенност са от решаващо значение за изследването на стволови клетки, позволявайки изучаването на повърхностни маркери за специфични подгрупи клетки, включително стволови клетки. Стволовите клетки играят ключова роля в лечението чрез повлияване и модулиране на ECM, размножаване и интегриране в новообразувана тъкан.За да разберем този процес, ние анализирахме РНК профили, фокусирайки се върху протеини на повърхностно прикрепване, ECM компоненти и ремоделиращи ензими.

Резултатите разкриват различни модели на експресия в тестваните клетки, категоризирани в 6 групи въз основа на тяхната роля в клетъчната адхезия. Нейерархичният и йерархичен клъстерен анализ показва корегулирани гени в групите, което предполага двойки като DPSC/BMSC, SHED/GMSC и SCAP/PDLSC. Тези групи стволови клетки, получени от зъбите, могат да имат специфични характеристики и функции и ембрионално развитие. Освен това, GMSC и SHED показват подобни профили на експресия в сравнение с BMSC.

В първата група, която включва ECM (екстрацелуларен матрикс) и компоненти на базалната мембрана, наблюдавахме значителна свръхекспресия на гени като LAMA2, LAMB1, VCAN и COL14A1 в различни клетъчни групи, включително DPSC, SCAP, PDLSC, SHED и GMSC.

Ламинините са голяма група протеини на базалната мембрана, които са съставени от алфа, бета и гама субединици, като LAMA1-5 гените кодират ламинин алфа субединиците от 1 до 5 аналогично.

LAMA2 и LAMB1 са важни за формирането и поддържането на базалната мембрана, играейки критична роля в клетъчната адхезия, миграция и сигнализация.

Генът LAMA2, свързан с ламининова субединица алфа 2, е подробно изследван в различни тъкани. Това обаче е първият случай на неговото разследване в дентални MSC. Трябва да се отбележи, че всички тествани типове клетки показват свръхекспресия на LAMA2, като най-ниската свръхекспресия се наблюдава при SHED.

Инхибирането на LAMA 2 инициира промотирането на остеогенната диференциация и инхибира адипогенната както in vitro, така и in vivo.

Свръхекспресията на LAMA2 ефективно супресира остеогенната диференциация специално про MSCs.

LAMB1 е най-разпотространения ламинин в човешкия организъм. Той участва в клетъчната адхезия, сигнализация и миграция на клетките. Основно значение има за поддържане на базалната мембрана. Взаимодейства с колагени, фибрнонектини, рецептори по повърхността на клетката, включително и интегрини и дистогликани, за клетъчна сигнализация. Експресията на LAMB1 остава последователна във всички тествани типове клетки. Повишената експресия на SCAP е обеснима като структурата отговаряща за сформирането на цялата зъбна структура и даваща сигнализация за диференциация на прилежащите тъкани. Втори по експресия са DPSC, която също е обеснима поради големия регенеративен потенциал на стволовите клетки от пулпа, дори и във възрастенорганизъм. LAMB1, решаващ компонент на ECM, играе роля в клетъчната адхезия, миграцията и организацията на тъканите. Споделената му експресия сред тези различни клетки подчертава ролята й в поддържането на целостта и функцията на тъканите. Тази последователност сред зъбните стволови клетки и фибробластите ги позиционира като обещаващи кандидати за регенеративни терапии и приложения за тъканно инженерство, наред с добре установените BMSCs.

SHED има понижена експресия на LAMA3, който също е важен компонент на базалната мембрана и играе роля в клетъчната адхезия и мобилност. SCAP, от своя страна, показаха понижена експресия на LAMB3, което може да има ефект върху стабилността и функцията на базалната мембрана в тези клетки.

Вариабилните комбинации между субединиците на ламинините и техния баланс на инхибиране и експресия, задава различни сигнали за тъканна диференциация на OCSC. Тези открития биват подкрепени и от по

скорошни поручвания, които доказват връзката на регулаторните механизми с регулацията на Hedgehod Signaling Pathway.

Втората група обхваща молекули за клетъчна адхезия и интегрини, които играят ключова роля в регулирането на клетъчните взаимодействия, миграция и сигнализация, което е от съществено значение за развитието и поддържането на тъканите. В нашето проучване установихме, че различните типове клетки свръхекспресират различни интегрини, което подчертава тяхната специализация и функционална разнообразност.

DPSC свръхекспресираха ITGA4, ITGA6, ITGB3, ITGB1 и ITGA8, което предполага, че тези клетки имат повишен капацитет за адхезия и взаимодействие с екстрацелуларния матрикс, улеснявайки тяхната роля в регенерацията на зъбната пулпа.

SHED свръхекспресираха ITGA4, ITGB1, ITGB3 и ITGA1. Това показва, че тези клетки имат специфични адхезионни свойства, които ги правят подходящи за терапевтични приложения в стоматологията и регенеративната медицина.

SCAP свръхекспресираха ITGA4, ITGA6,ITGB1, ITGB4 и ITGA8. Тази свръхекспресия предполага, че SCAP могат да играят важна роля в заздравяването и регенерацията на тъканите, поради тяхната способност за ефективна клетъчна адхезия и миграция.

PDLSC свръхекспресираха ITGA6 и ITGB3, което показва, че тези клетки са особено добре адаптирани за поддържане и регенерация на периодонталните тъкани, като същевременно поддържат силни адхезионни връзки с екстрацелуларния матрикс.

GMSC свръхекспресираха ITGA4, ITGA8 и ITGA2, което предполага, че тези клетки имат потенциал за използване в регенеративната медицина, особено в приложения, свързани с устната кухина и гингивалната тъкан.

От друга страна, ITGA7 беше с понижена експресиран във всички типове клетки, което може да означава ограничена роля на този интегрин в тези конкретни стволови клетки. SCAP, PDLSC и GMSC показаха недостатъчна експресия на ITGA3, а GMSC показаха недостатъчна експресия на ITGB2. Тези недостатъчни експресии могат да са свързани със специфични функционални ограничения или особености на тези клетъчни типове.

Интегрините, важни за клетъчната адхезия и сигнализиране, показват разнообразни модели на експресия в клетъчните типове. ITGA6 показва по-висока експресия в PDLSC, DPSC и SCAP, в съответствие с резултатите от имунофлуоресценцията. Тази повишена експресия на ITGA6 в тези популации от зъбни стволови клетки има значителни последици за техните функции. В PDLSC подчертава ролята на ITGA6 в закрепването на клетките към периодонталния лигамент, което е от съществено значение за прикрепването и мобилността на зъбите. За DPSC и SCAP, повишеният ITGA6 вероятно медиира взаимодействията между клетката и матрицата, като подобрява адхезията и потенциално допринася за възстановяването и регенерацията на зъбната тъкан.

α8-интегрин субединицата (ITGA8) се експресира в мезенхимни клетки, които се намират в васкуларни клетки на гладката мускулатура, *mesangial cellas renibus,* някой фибробласти и недиференциирани епителни клетки. (365- 368). След като димеризира с β1-интегрин субединица, започва да действа като рецептор за фибронектин, витронектин, остеопонтин, tenascin C, нефронектин и фибрилин-1. Друга специфична комбинация от субединици на интегрините е αvβ5 интегрин, който във фибробластна клетъчна култура повишава експресията на гена α2(I) collagen. Докато при подтискане/супресия/инхибиране на β3 интегриновата субединица при фибробластитесе намаляват нивата на експресията на колаген I.

Третата група включва матрични металопротеинази (MMPs) и тъканни инхибитори на металопротеинази (TIMPs), които играят критична роля в регулацията на екстрацелуларния матрикс (ECM) чрез деградация на неговите компоненти. Тези молекули са от съществено значение за тъканното ремоделиране, заздравяването на рани, и други физиологични процеси, като също така участват в патологични процеси като туморогенеза и метастази.

DPSC свръхекспресират на MMP10, MMP11, MMP12 и MMP13. Тази свръхекспресия предполага, че DPSC имат повишен капацитет за разграждане и ремоделиране на ECM, което е критично за процесите на регенерация на денталната пулпа и възстановяване на зъбната тъкан.

SHED свръхекспресираха MMP1 и MMP3 и понижена експресия на TIMP1. MMP1 и MMP3 са ключови ензими, участващи в деградацията на колаген и други компоненти на ECM, което може да подпомага регенеративните способности на SHED. Недостатъчната експресия на TIMP1 обаче може да доведе до неконтролирана MMP активност, което може да има негативни последици за тъканната структура и функция.

SCAP свръхекспресираха MMP8, MMP10, MMP11 и MMP13. MMP8, известен също като колагеназа-2, играе важна роля в разграждането на колаген тип I, което е основен компонент на костната и зъбната матрица. Тази свръхекспресия показва, че SCAP са особено добре подготвени за участие в процесите на костна и зъбна регенерация.

PDLSC показаха свръхекспресия на MMP8, MMP11, MMP13 и MMP16. MMP16, също известна като MT3-MMP, е мембранно-свързана металопротеиназа, която играе роля в активирането на други MMPs и ремоделирането на ECM. Тази свръхекспресия предполага, че PDLSC са особено ефективни в ремоделирането на периодонталните тъкани, което е

от съществено значение за поддържането на зъбите и техните поддържащи структури.

GMSC свръхекспресираха MMP1, MMP3, MMP10 и MMP11. Тези MMPs са свързани с разграждането на колаген и други ECM компоненти, което показва, че GMSC имат силен потенциал за участие в регенерацията на гингивалната тъкан. Свръхекспресията на тези MMPs може да подпомогне възстановяването на гингивалната структура и функция след увреждане или заболяване.

MMP11 отговаря за ремоделирането на извън клетъчния матрикс, особенно разграждането на протеогликани, фибронектини и ламинини. Както се очакваше PDLSC е с най-висока експресия, т.к. те претърпяват фукционално физиологични промени ежедневно, SCAP са по подобен начин, но само през периода на кореновото развитие и моделиране на костта през растежните периоди на развитие. От друга страна MMP1 разгражда извънклетъчните матрикс компоненти, както и колаген 1,2,3 (колагеназа). Разцепва тройната спирала на фибриларите колагени. Високата експресия на този ген от GMSC се обеснява с възможността за реформиране и придвижване на съединителната тъкан.

MMP3 също отговаря за моделирането на извънклетъчния матрикс, протеогликаните, ламинини, фибронектини и колаген 3,4,9. В нашия експеримент се наблюдава висока експресия на MMP3 от SHED. Тази експресия се обеснява поради пробива на временните и постоянните зъби и пиковете на растеж през първите 12 години. През този период има бурни растежи на тъканите и непрекъснатото им ремоделиране.

В контекста на развитието на зъбите и пародонта, SCAP и PDLSC са отговорни за формирането на различни структури, което може да обясни тяхната значителна свръхекспресия на тези MMP.

Всички тествани клетъчни типове показват наличието на различни MMP, решаващи ензими, участващи в ремоделирането на ECM. Тези ензими играят съществени роли, които не са специфични за стволовите клетки, но са основни в различни физиологични процеси. Те са отговорни за поддържането на структурната цялост на ECM и участват в развитието на тъканите, зарастването на рани и възстановяването на тъканите. Техните функции се простират отвъд стволовите клетки, като допринасят за поддържането на тъканния баланс и отговор както на нормални, така и на патологични състояния. По този начин те играят съществена роля във физиологията и патологията на тъканите, подобно на някои от функциите, проявени от тестваните стволови клетки.

Четвъртата група включва молекули на клетъчна адхезия и гени за взаимодействие между клетките, които играят ключова роля в регулирането на клетъчните взаимодействия, адхезията и сигнализацията, важни за развитието, поддържането и регенерацията на тъканите.

DPSC свръхекспресираха CNTN1, NCAM1 и VCAM1. CNTN1 (контактин 1) е важен за невроналното развитие и клетъчната адхезия, NCAM1 (невронална клетъчна адхезионна молекула) играе роля в клетъчната комуникация и миграция, а VCAM1 (съдова клетъчна адхезионна молекула 1) е критична за взаимодействието между клетките и екстрацелуларния матрикс, което улеснява тъканната регенерация.

SHED бяха единствената група, която свръхекспресира CLEC3B (C-тип лектинов домейн съдържащ 3B), който е свързан с имунния отговор и взаимодействието между клетките. Те също така показаха повишена експресия на CNTN1 и VCAM1, което предполага, че SHED имат специфични адхезионни и комуникационни свойства, които могат да бъдат полезни за имуномодулация и регенеративна терапия.

SCAP свръхекспресираха CNTN1, NCAM1 и VCAM1. Тази свръхекспресия подчертава тяхната способност за ефективно взаимодействие и адхезия, които са от съществено значение за тяхната роля в зъбната и костната регенерация, като същевременно подпомагат тяхната интеграция в тъканите.

PDLSC свръхекспресираха CNTN1 и VCAM1, с най-висока свръхекспресия на NCAM1. Това показва, че тези клетки са добре подготвени за взаимодействие с околните клетки и тъкани, което е критично за поддържането и регенерацията на периодонталните структури, като същевременно поддържат здравето на зъбите и техните поддържащи тъкани.

GMSC свръхекспресираха CNTN1, NCAM1 и VCAM1. Тази свръхекспресия предполага, че GMSC имат значителен потенциал за взаимодействие и адхезия с други клетки и екстрацелуларния матрикс, което ги прави подходящи за регенеративни приложения в гингивалната тъкан и устната кухина.

VCAM1 има критична роля при медиирането на левкоцитната адхезия и трансендотелната миграция по време на възпалението. Висока е експресията му по време на възпалитена реакция. Също така участва в регулацията на ангиогенезата. Високата експресия на DSPS се обеснява с факта, че пулпата е най-васкуларизирания орган в зъба и е основен регулатор на възпалителните процеси и развитието им.

Петата група включва гени за клетъчна сигнализация и трансдукция, които играят ключова роля в преноса на сигнали от клетъчната повърхност до ядрото и регулирането на клетъчните отговори.

SCAP свръхекспресираха CTNNB1 (катенин бета-1), който е ключов фактор в сигналния път на Wnt и играе роля в регулацията на клетъчната

пролиферация, диференциация и съхранение на стволови клетки. Това подчертава важността на активацията на сигналния път на Wnt в SCAP за тяхната способност за самообновление и диференциация.

CTNNB1 (β- катенин) или още познат като Е кадхерин е основен за актиновия цитоскелет. Също така той е трансдукционен активатор в Wnt сигнален път и регулира експресията на цели гени участващи в клетъчната пролиферация и диференциация. Високата експресия на SCAP се обеснява с основната му функция за образуване на корен и стумилиране на диференциация и оформяне на прилежащите тъкани.

Същевременно SCAP показаха минимална експресия на CTNND2 (катенин делта-2), който е адхезионен протеин и играе роля в клетъчната адхезия и съединението на клетъчните мембрани. Това намалено ниво на CTNND2 може да влияе на клетъчната адхезия и взаимодействие на SCAP с околните клетки и екстрацелуларния матрикс.

GMSC свръхекспресираха CTNND2, което подчертава важността на този ген за клетъчната адхезия и съединението на клетъчните мембрани в GMSC. Тази свръхекспресия може да улесни клетъчната адхезия и взаимодействието на GMSC с други клетки и тъкани, което е от съществено значение за тяхната роля в регенерацията на гингивата и участието им в имунния отговор.

Сред 5-те изследвани групи от OCSC установихм,е че GMSC се открояват като единствената група с висока експресия на CTNND2. CTNND2 (катенин делта 2) играе решаваща роля в клетъчната адхезия и организацията на тъканите. Повишената експресия на CTNND2 в GMSC предполага неговото потенциално значение за поддържане на клетъчната цялост и улесняване на взаимодействията със съседни клетки. Диференциалната експресия на CTNND2 в GMSC в сравнение с други групи

зъбни стволови клетки подчертава уникалните характеристики и функционални свойства на GMSC.

Шестата група обхваща други участващи компоненти, които са важни за функционирането и регулацията на клетките, както и за тъканната хомеостаза и регенерацията.

DPSC свръхекспресира COL16A1 (колаген 16A1), THBS2 (тромбоспондин 2), THBS3 (тромбоспондин 3) и SGCE (саркоцинеген 1). COL16A1 участва в структурата и функцията на екстрацелуларния матрикс, а THBS2 и THBS3 са важни за клетъчната адхезия и сигнализацията. SGCE играе роля в клетъчната миграция и адхезията към екстрацелуларния матрикс. Тези гени могат да бъдат от ключово значение за функциите и взаимодействията на DPSC в денталната тъкан и тяхната роля в регенеративните процеси.

SHED показаха само свръхекспресия на THBS2 и ниска експресия на HAS1 (хиалуронан синтаза 1) и TIMP1 (тъканен инхибитор на металопротеинази 1). THBS2 може да бъде важен за клетъчната адхезия и сигнализацията в SHED, докато ниската експресия на HAS1 и TIMP1 може да влияе на процесите на екстрацелуларна матрикса и тъканната ремоделиране.

SCAP свръхекспресираха COL16A1, THBS2 и THBS3. Тези гени могат да участват в клетъчната морфология, миграцията и взаимодействието с околните клетки и матрикса, което е от съществено значение за регенерацията и поддържането на структурата на зъбната тъкан.

PDLSC свръхекспресира COL16A1 и показва повишена експресия на SGCE, но недостатъчна експресия на HAS1. Тази комбинация от гени може да има важни въздействия върху клетъчната адхезия, миграцията и тъканната ремоделиране в периодонталните структури.

GMSC не показаха висока експресия на COL16A1, THBS2, THBS3, SGCE, а също така показаха ниска експресия на TGF-b1, HAS1 и ANOS1. Недостатъчната експресия на същите може да влияе на процесите на клетъчната пролиферация, диференциация и тъканната ремоделиране в гингивалната тъкан.

Изследвахме експресията на различни колагенови гени, ключови компоненти на ECM. Сред всички тествани клетъчни типове, един ген постоянно показва значителна експресия: COL1A1. Предишни проучвания вече подчертават решаващата роля на COL1A1 в зъбните стволови клетки и неговото значение за регенерацията на тъканите. COL1A1 е особено важен в зъбните тъкани, осигурявайки структурна опора, здравина и стабилност в периодонталния лигамент и дентина. Силната експресия на COL1A1 подчертава първостепенното му значение в биологията на зъбните стволови клетки. Сред другите тествани колагенови гени, експресията на COL14A1 в PDLSC и SHED е забележителна. Това може да се обясни с ембриологичните функции и функциите на развитието на тези клетки. Подобно на COL1A1, COL14A1 също играе важна роля в поддържането на целостта и структурата на тъканите, което е свързано с функциите на периодонталния лигамент и неговата роля на закотвяне в зъбите. В допълнение, споделеното повишаване на експресията на COL16A1 в GMSC и SHED подчертава тяхното активно участие в поддържането и запазването на структурната цялост на зъбните структури и гингивата, които са поставени под постоянни механични натоварвания от дъвкателния акт.

COL4A1 е важен колаген, който допринася за стабилността и функцията на екстрацелуларния матрикс, предоставяйки механична подкрепа на клетките.

Въпреки тези положителни резултати, открихме и понижени експресии в специфични клетъчни групи. DPSC понижена експресия на

COL4A1, който е критичен за структурата на базалната мембрана и може да влияе на способността на тези клетки да се интегрират в тъканите

Анализът на генната експресия показа обширен ECM профил на ремоделиране на мезенхимните клетъчни култури. Въпреки че този резултат беше очакван, ние открихме фини, но отчетливи разлики в моделите на експресия, които ни дават по-добро разбиране на специфичните свойства на зъбните тъкани. Следното изследване има потенциално ограничение в използването на RT-PCR, а не на по-напреднали техники като секвениране на РНК на отделна клетка. RT-PCR предлага специфичност към известни РНК последователности/секвенции, но е ограничен в откриването на нови видове РНК и в способността си предоставя по-широко изображение на транскриптома. В същото време количественият анализ на RT-PCR е ограничен от ограничен динамичен диапазон, което налага внимателно нормализиране, предизвикателство, което не е толкова ясно изразено при секвенирането на РНК, което може по-точно да измерва генната експресия в широк диапазон. Друго ограничение е фактът, че всички маркери, идентифицирани в това проучване, са оценени in vitro. Невъзможността за откриване на тези маркери in vitro намалява възможността за използване на тези конвенционални маркери за терапевтични приложения.

Тези детайлни генни профили предоставят ценна информация за функционалните характеристики на различните популации стволови клетки и тяхната потенциална роля в регенеративната медицина. Разкритите вариации в генната експресия подчертават сложността и специализацията на всяка клетъчна група, което е от съществено значение за бъдещите терапевтични приложения и изследвания.

Тези открития подчертават сложността и вариабилността на генната експресия в различните типове стволови клетки и посочват специфични и конкретки молекулни таргети за подобрение и оптимизация на

стволовоклетъчните терапии. Дефинирането на тези различия е от съществено значение за разработването на персонализирани медицински подходи и за оптимизиране на регенеративните стратегии, базирани на стволови клетки.

Обобщено, тези резултати подчертават важността на другите участващи компоненти за функциите и взаимодействията на стволовите клетки в различни тъкани и техния потенциал за приложение в регенеративната медицина

5.3 Пролиферативен потенциал

Стволовите клетки от орален произход са лесно достъпни и се добиват чрез рутинни процедури. Сравняването на техния пролиферативен потенциал е важно за установяване на различията между тях. Използването на GMSC и BMSC е от значение, тъй като те са най-изучаваните клетки от шестте типа. Чрез сравнение с тях можем да определим към кой от двата профила принадлежат останалите четири типа клетки или дали са напълно различни.

BMSC имат стабилна пролиферация и с всеки следващ пасаж възстановяват близък брой клетки. В същото време, при GMSC се наблюдава експанзивност във втория пасаж, с рязко увеличаване на броя клетки между първи и втори пасаж. Това се обяснява с големия потенциал на GMSC за регенерация и възстановяване на рани в устната кухина. Подобен профил на GMSC има и PDLSC. При тях броят клетки между първи и втори пасаж почти се утроява, като в четвърти пасаж се наблюдава повторно увеличение, което показва техния голям запас и експанзивност. PDLSC изпълняват специфична функция, отговаряща за зъбозадържащия апарат на зъба към алвеоларната кост. Тъй като тези структури са под непрекъснато напрежение и модификации в зависимост от зъбното

натоварване, тези клетки трябва да имат голям пролиферативен потенциал за бързи репаративни функции.

При SHED и DPSC се наблюдава повторяемост на пролиферацията между пасажите, като броят клетки при SHED е по-нисък от този на DPSC. Тези резултати са очаквани, тъй като и двата вида клетки изпълняват една и съща функция. Разликата е, че SHED имат програмирана дегенерация и „срок на годност“ до момента, в който цялата пулпа на временните зъби дегенерира и изчезва. От друга страна, тази дегенерация инициира диференциация на прилежащите тъкани, както и ерупционните процеси на прилежащите постоянни зъби.

SCAP, от своя страна, има нестандартен пролиферационен профил, който не може да бъде сравнен с останалите видове клетки. Това се дължи на факта, че SCAP имат уникалната функция на формиране на корена на зъба и иницииране на различни диференциационни механизми в прилежащите тъкани. Тези клетки и техните регенеративни функции могат да се използват не само за възстановяване на тъкани в устната кухина, но и за проучване на техния мезенхимен потенциал в останалите тъкани в човешкото тяло.

5.4 Потенциал за многолинейна диференциация

В нашето изследване ние изследвахме готовността за диференциация на стволови клетки, получени от зъби, с основен фокус върху адипогенните, остеогенните и хондрогенните пътища. Проучихме DPSC, SHED, PDLSC, SCAP, BMSC и GMSC, за да придобием представа за техните регенеративни способности. Нашето изследване показва отчетливи разлики в готовността за диференциация на различните клетъчни култури след краткотрайна инкубация в различни условия. Това сравнение е от решаващо значение за разбирането на тяхната плурипотентност и намаляване на несигурността в

хетерогенни култури от възрастни стволови клетки, включително зъбни, и за разработване на бъдещи протоколи за клинично приложение. Въпреки сравнително краткия период на диференциация в сравнение с традиционните протоколи, нашето изследване подчертава, че значителна диференциация между клетките започва да се проявява само след 10 дни. Тази времева рамка служи като решаващ маркер за тяхната готовност за диференциация. Трябва да се отбележи, че остеогенната диференциация е наблюдавана във всички типове клетки в различна степен, заедно с хондрогенната диференциация. При диференциацията на адипоцитите, PDLSCs и SCAPs показват по-високи нива на индукция, но като се има предвид удължена продължителност, други видове клетки вероятно ще се включат допълнително в този процес на диференциация. Въпреки че текущите изследвания се фокусират предимно върху регенеративните приложения на OCSC при възстановяване на орална и лицево-челюстна тъкан, от решаващо значение е да се признаят техните по-широки мезенхимни характеристики. Тези многостранни характеристики разширяват значението на OCSC отвъд денталната и костна регенерация, предлагайки потенциал в различни приложения за тъканно инженерство. Като се има предвид тяхната способност за многолинейна диференциация и активно участие в възстановяването на тъканите в устната кухина, по-нататъшното изследване на техните клинични последици става решаващо. С напредването на изследванията вниманието се измества към разбирането не само на пътищата на диференциация на OCSC, но и на техните регулаторни механизми, проправяйки пътя за по-широки приложения в контекста на мезенхимна диференциация в различни медицински дисциплини. Нашето изследване имаше за цел да разкрие свойствата на стволовите клетки в рамките на OCSC въз основа на специфични маркери, стъпка към напредване на терапията със стволови клетки и клинична интеграция.

Откритите вариации в готовността на клетъчните култури за диференциация са тясно свързани с разликите в експресията на маркери и специфичния, различен брой клетки, имащи готовност за диференциация в съответните клетъчни култури, резидиращи в различните орални тъкани. Тези вариации се обуславят от множество фактори, включително генетични и епигенетични особености, локални микросредови влияния, както и от конкретните физиологични и патофизиологични условия в оралните тъкани, от които произхождат клетките. Например, клетките, извлечени от гингивалната тъкан, могат да имат различен потенциал за диференциация в сравнение с тези от периодонталния лигамент или зъбната пулпа, поради различията в тяхната микроокружа среда и функционални изисквания.

Наблюдаваните разлики в експресията на маркери като CD44, CD49, и CD146, които са свързани със стволовата клетъчност и потенциала за мултипотентна диференциация, са от съществено значение за разбирането на диференциационните способности на тези клетки. Освен това, наличието на специфични трансдукционни пътища, активирани в различни клетъчни култури, също играе ключова роля за тяхната готовност за диференциация. Например, активирането на Wnt/β-катенин сигналния път може да стимулира остеогенната диференциация, докато инхибирането на този път може да подкрепи адипогенната диференциация.

Изследванията показват, че не само количественият, но и качественият аспект на клетъчните култури оказва влияние върху тяхната способност за диференциация. Разнообразието в експресията на гени, свързани с клетъчна адхезия, миграция и комуникация, допълнително подчертава сложността на регулацията на клетъчната диференциация. Например, повишената експресия на маркери за клетъчна адхезия може да улесни взаимодействията между клетките и извънклетъчния матрикс, които са критични за успешната диференциация в специфични тъкани.

Настоящото проучване е предмет на няколко ограничения, обхващащи общи опасения, свързани с MSC, както и конкретни въпроси, които се отнасят за настоящото проучване. Значителна област на безпокойство включва продължителното in vitro култивиране на тези клетки, което може да предизвика стареене на клетките, потенциално променяйки тяхната морфология и модифицирайки експресията на маркери на стволови клетки. Последващите проучвания трябва да имат за цел да изследват активността на теломеразата, като се занимават с процеса на стареене, изследват клетъчната повърхност и интрацитоплазмената експресия на стволови и диференциационни маркери и провеждат по-цялостна оценка на тяхната морфология в разширени клетъчни пасажи. По-специално, това проучване се фокусира единствено върху 2D култури, което налага необходимостта от изследване на генотипа, фенотипа и цялостното биологично поведение на изследваните клетки в рамките на 3D култури в бъдещи изследвания.

Тези открития подчертават значението на прецизното характеризиране на клетъчните култури и тяхната среда при разработването на регенеративни терапии и стратегиите за тъканно инженерство. Също така, разбирането на механизмите, които регулират готовността на клетките за диференциация, може да доведе до нови подходи за модификация на тези клетки, с цел подобряване на тяхната ефективност и функционалност в клинични приложения.

6. Заключение

Този анализ на стволови клетки, получени от устната кухина, разкрива различни и специфични модели на експресия на повърхностни маркери, ECM компоненти, ECM ремоделиращи ензими, колагенови гени, интегрини и потенциал за диференциация. Тези открития могат да дадат представа за функционалните свойства на тези клетъчни популации. Нашето проучване има за цел да разкрие нюансираните характеристики, специфични за всеки отделен тип клетки. Чрез експериментиране и анализ очакваме не само да разберем индивидуалните им функции, но и да придобием по-задълбочена представа за колективното им поведение. Разбирането както на техните споделени характеристики, така и на различни атрибути е важна стъпка в използването на техния регенеративен потенциал в различни контексти на възстановяване и регенерация на тъкани, като по този начин се напредва в областта на регенеративната медицина и тъканното инженерство. Като допринасяме значително за напредъка на знанията в регенеративната медицина и тъканното инженерство, ние се стремим да проправим пътя за трансформиращи пробиви в здравеопазването.

7. Изводи

- В различните орални тъкани съществуват популации от фибробластоподобни стволови клетки със *сходен фенотип*, силно различаващи се по своите биологични свойства

✓ Експресиращи различен набор от стволово-клетъчни маркери

✓ Експресиращи различен набор от адхезионни маркери

✓ Експресиращи различен набор от диференциационни маркери

- Различните стволово-клетъчни популации в оралните тъкани притежават различен потенциал за диференциация

8. Приноси

- Оптимизирани са и утвърдени протоколи за изолиране на стволово-клетъчни култури от различни тъкани от орален произход

- Доказан е стволовият характер на култивираните клетки чрез определяне на пролиферативния им капацитет и експресията на специфични стволово-клетъчни маркери.

- Доказана е способността на изолираните клетки да диференцират до остеоцитно-подобни и адипоцитно-подобни клетки с използването на утвърдени диференциационни протоколи.

- Създадени са експресионни профили на различните субпопулации от изолирани стволово-клетъчни култури от орален произход

- Създанени са диференциационни профили на различните субпопулации от изолирани стволово клетъчни култури от орален произход

9. Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Miteva M. The Potency of Dental Mesenchymal Stem Cells: A Short Review of the Literature. Journal of Current Medical Research and Opinion. 2019 Aug 19;

2. Zornitsa Mihaylova, Miteva M, Pavel Stanimirov, Evgeniy Aleksiev, V. Mitev, Nikolay Ishkitiev. Expression of senescence markers in human PDL stem cells after long-term cultivation in vitro. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2021 Jan 1;35(1):1024–30.

3. Miteva M, Zornitsa Mihaylova, Vanyo Mitev, Evgeniy Aleksiev, Pavel Stanimirov, Praskova M, et al. A Review of Stem Cell Attributes Derived from the Oral Cavity. International dental journal. 2024 Apr 1;

10. Спечелени награди

- 1st place in Dentistry Oral Session 16th International Congress of Medical Sciences for students and young doctors, Medical University of Sofia, Bulgaria, [May 11- 14,2017]

- Robert Frank Junior Award IADR/PER General Session & Exhibition in London, England [July 25-28,2018]