МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

Марина Валериева Митева

Тема

Анализ на експресионния и диференциационния профил на орални стволови клетки от възрастен организъм

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научна специалност: Биохимия

Шифър: 4.3

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

Акад. Проф. д-р Ваньо Митев дм, дбн

Доц. Мария Драгнева, дб

София

2024

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

СЪДЪРЖАНИЕ:

Благодарности 5
Използвани съкращения 6
1. Въведение 11
2. Литературен обзор 14
2.1. Ембрионално развитие 14
2.2. Зъбна ембриология 16
2.2.1. Развитие на емайлов орган на постоянни зъби и съдба на денталната ламина 18
2.2.2. Стадии на развитие 19
2.3 Стволови клетки 35
2.4 Стволови клетки от зъбен произход 39
2.4.1 Стволови клетки от зъбна пулпа 41
2.4.2 Стволови клетки от временни зъби 42
2.4.3 Стволови клетки от периодонтален лигамент 43
2.4.4 Стволови клетки от апикална папила 44
2.4.5 Мезенхимни клетки от гингива 46
2.5 Имунофлуоресцентни повърхностни маркери 47
2.6 Гени за човешки екстрацелуларни матрикс и адхезионни молекули 56
2.6.1 Интегрини 56
2.6.2 Матрикс металопротеинази 61
2.6.3 Колагени 63
2.7.4. Ламинини 66
2.7.4 Гликопротеини 69
2.7.5 Селектини 72
2.7.6 Катенини 73
2.5.7 Тромбоспондини 76
2.7.8 Други гени свързани с екстрацелуларни матрикс и адхезионни молекули 79

3. Цели и задачи 88
4. Материали и методи 89
4.1. Изолиране и култивиране на стволови клетки 90
4.2 Характеризиране на стволови клетки от зъбен произход 93
4.3 RT-PCR 98
4.1.1 Праймери и ензими 99
4.1.2 Едностъпков RT-PCR 99
4.1.3 Праймери за обратна транскриптаза 100
4.1.4 Изисквания за двустъпков RT-PCR 101
4.1.5 Ефект на вторичната структура на РНК 101
4.1.6 Ензими използвани за RT-PCR 102
4.1.7 Мултиплексен PCR и RT-PCR 103
4.2 Тествани гени 104
4.3 Адипогенна, хондрогенна и остеогенна in vitro диференциация 106
4.4 Статистически анализ 107
5. Резултати 108
5.1 Имунофлуоресценция 109
5.2 RT-PCR 113
5.3 Пролиферативен профил 120
5.4 Потенциал за многолинейна диференциация 121
6. Дискусия 123
6.1. Стволови клетки и диференциационни маркери 125
6.2 Анализ на генна експресия 127
6.3 Пролиферативен потенциал 140
6.4 Потенциал за многолинейна диференциация 142
7. Заключение 145
8.Изводи 146
9.Приноси 146
10.Библиография 147
11.Публикации във връзка с дисертационния труд 177
12. Спечелени награди 177

Благодарности

Изказвам най-сърдечна благодарност на моите научни ръководител, акад.Ваньо Митев и доц. Мария Драгнева, за предоставената възможност, напътствия и вдъхновение през целия процес на работа по докторантурата.

Специални благодарности на д-р Николай Ишкитиев за неоценимата подкрепа и помощ както в това проучване, така и в цялата ми академична кариера. Вашата експертиза и отдаденост бяха от решаващо значение за успешното завършване на този проект.

Сърдечно благодаря на членовете на научната комисия за отделеното време и професионализъм, както и за ценните коментари и препоръки, които спомогнаха за подобряването на моята дисертация.

Искрена благодарност към колегите от катедра „ Медицинска химия и биохимия“, за топлия прием и за тяхната постоянна морална подкрепа и разбиране. Вашата помощ беше изключително важна за мен през всички етапи на изследването.

Накрая, но не на последно място, благодаря на моето семейство и приятели за тяхната непрестанна подкрепа, търпение и вяра в мен. Без вашата любов и подкрепа това постижение не би било възможно.

Благодаря на всички, които по един или друг начин допринесоха за успеха на този проект.

Използвани съкращения

MSCs - мезенхимни стволови клетки

BMSC - мезенхимните стволови клетки от костен мозък

OCSC - стволови клетки от устна кухина / орални стволови клетки

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

DFSC - зъбни фоликулни стволови клетки

GMSC - гингивални мезенхимни стволови клетки

PDL - пародонталният лигамент

ALP - алкална фосфатаза

GAPDH - глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа

qRT-PCR - полимеразна верижна реакция в реално време

HH - Hedgehog сигнален път

SHH- Sonic Hedgehog сигнален път

Edn1 - ендотелин-1

EMT - епително-мезенхимна трансформация/ транзиция

HERS - епителна коренова обвивка на Hertwig

FGF-8 - фибробластен растежен фактор

Lh-6 и Lh-7 - Lim home-box домейн гени

Pax-9 - сдвоен хомоеротичен ген

PSC - Плурипотентните стволови клетки

ESCs- Ембрионалните стволови клетки

iPSCs - Индуцираните плурипотентни стволови клетки

ASCs - възрастни стволови клетки

TSCs - тъканни стволови клетки

BFPSC - стволови клетки от букална мастна подложка

VEGF - съдов ендотелен растежен фактор

TGF-β1- трансформиращия растежен фактор-бета

BMP2 - костен морфогенетичен протеин 2

BMP4- костен морфогенетичен протеин 4

OCT 4 - октамер свързващ транскрипционен фактор

EVs - извънклетъчните везикули

BMPs - костни морфогенетични протеини

CM - кондиционираната среда

NGFR - неврален растежен фактор

CD49f - интегрин α6

COL1A2 - Колаген тип I α 2

COL3A1 - Колаген тип III α 1

ECM - извънклетъчната матрица

NSCs -неврални стволови клетки

CK19 - Цитокератин 19

MCAM - адхезионна молекула на меланомна клетка

TFRC - трансферинов рецепторен протеин 1

SCFR - рецептор на фактор на стволови клетки

GIST - томашно-чревни стромални тумори

AML - остра миелоидна левкемия

DSPP- дентинов сиалофосфопротеин

DSP - ентинов сиалопротеин

DPP - дентинов фосфопротеин

HMG- групата на транскрипционни фактори с висока мобилност

KGF - кератиноцитен растежен фактор

FGF - фибробластния растежен фактор

ITGA1 - алфа-1 субединицата на интегрин

ITGA2 - алфа-2 субединицата на интегрин

ITGA3 - алфа-3 субединицата на интегрин

ITGA4 - алфа-4 субединицата на интегрин

ITGA5 - алфа-5 субединицата на интегрин

ITGA6 - алфа-6 субединицата на интегрин

ITGA7 - алфа-7 субединицата на интегрин

ITGA8 - алфа-8 субединицата на интегрин

ITGAL- алфа-L субединицата на интегрин

ITGAM- алфа-M субединицата на интегрин

ITGAV - алфа-V субединицата на интегрин

ITGB1 - бета-1 субединицата на интегрин

ITGB2 - бета-2 субединицата на интегрин

ITGB3 - бета-3 субединицата на интегрин

MMP - Матрични металопротеинази

TIMPs - тъканни инхибитори на металопроеинази

OI - остеогенеза имперфектна

LAMA1 - Ламинин-1

LAMA2 - Ламинин-2

LAMA3- Ламинин-3

H-JEB - Herlitz junctional epidermolysis bullosa

JEB - булозна епидермолиза

HA - хиалуронова киселина

NCAM1 - адхезионна молекула на невралните клетки 1

VCAM1 - васкуларна клетъчна адхезионна молекула 1

SELE - E-селектин

SELL - L-селектин

SELP - P-селектин

CTNND1 - δ-катенин 1

CTNNA1 - алфа-катенин

CTNNB1 - β-катенин

CTNND2 - δ-катенин 2

THBS1- Thrombospondin 1 / Тромбоспондин-1

THBS2- Thrombospondin 2 / Тромбоспондин-2

THBS3- Thrombospondin 3 / Тромбоспондин-3

HAS1 - хиалуронан синтаза 1

PECAM1 - тромбоцитна ендотелна клетъчна адхезионна молекула-1

SGCE - епсилон-саркогликан

MDS - синдром на миоклонус-дистония

SPG7 - параплегин

HSP7 - наследствена спастична параплегия тип 7

HSP - Наследствените спастични параплегии

ANOS1 - Anosmin-1

GnRH - гонадотропин-освобождаващия хормон

CTGF - растежен фактор на съединителната тъкан

CLEC3B - тетранектин

tPA - тъканен плазминогенен активатор

FGF-2- фибробластен растежен фактор 2

CNTN1 - Contactin-1

FN1- фибронектин 1

SPARC - секретиран протеин кисел и богат на цистеин

LRP1 - рецептора на липопротеин с ниска плътност

ECM1 - Екстрацелуларен матричен протеин 1

SPP1 - секретиран фосфопротеин 1

OPN - остеопонтин

VCAN - Versican

VTN - Витронектин

uPAR- урокиназа плазминогенен активатор

FBS - фетален телешки серум

DMEM - Клетъчната среда съдържа хранителна среда Dulbecco’s

RT-PCR - обратна транскрипция-полимеразна верижна реакция

RT - обратна транскрипция

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

РНК – рибонуклеинова киселина

AMV - тичи миелобластозен вирус

MMLV- вирус на миша левкемия на Moloney

1. Въведение

Първите описани мезенхимни стволови клетки (MSCs) са изолирани от костно-мозъчен аспират от възрастен организъм (1). 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 (2,3).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) (4).

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 (5). 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 (6). 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 (7). 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 (8).

Първите идентифицирани зъбни мезенхимни стволови клетки са DPSCs, изолирани от Gronthos et al (9) през 2000 г., последвани от SHED, както е описано от Miura et al (10) през 2003 г. Впоследствие са описани PDLSC, SCAP и DFSCs.(11,12,13). 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 (14). 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 (15). 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 (16) са направили сравнителен анализ на DPSC и PDLSC по отношение на техния диференциационен потенциал, докато Kunimatsi et al (17) 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 (19) 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 (20) 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 (21,22).

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 (23,24). 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. Литературен обзор

Изследването на стволовите клетки изисква цялостно разбиране на техния произход и механизми за програмиране, от разгадаването на техния ембрионален и/или постембрионален произход, до дешифрирането на сложните генетични и епигенетични програми, управляващи тяхната съдба. Навлизането в света на стволовите клетки разкрива плетеница от регулаторни мрежи, организиращи тяхната забележителна плурипотентност и регенеративен потенциал. Нещо повече, използването на стволовите клетки като мощни инструменти в регенеративната медицина предвещава нова ера на терапевтични иновации, предлагайки несравнима гъвкавост и потенциал в клетъчно-базирани терапии и откриване на лекарства. Този интердисциплинарен подход, интегриращ основни научни открития с транслационни приложения, има трансформиращи последици за човешкото здраве, проправяйки пътя към бъдеще, където регенеративният потенциал на стволовите клетки е напълно реализиран, предлагайки надежда на милиони, засегнати от инвалидизиращи болести и наранявания.

2.1. Ембрионално развитие

След началните етапи на ембрионалното развитие през първата и втората седмица, започва гаструлацията, която води до формиране на трите зародишни слоя и органогенеза, започва от третата седмица (25).

Първичният зародишен диск се състои от два слоя: ектодерма и ендодерма. На 14-ия ден се появява възелът, който чрез сигнални пътища (Nodal, SHH (HedgeHog сигнален път), FGF, Wnt (сигнален път), BMP, Notch) определя ляво-дясната асиметрия на ембриона (26-30). Ектодермата се удебелява и формира прехордалната плоча, която предшества развитието на орофациалната област. През третата седмица ектодермата образува третия зародишен слой - мезодермата, от която възниква интраембрионалната мезодерма. Нотохордата, формирана от мезодермата, индуцира развитието на невралната пластина и невралната тръба. Трите зародишни слоя формират основата за развитието на тъкани и органи (31).

Ектомезенхимната тъкан произлиза от клетките на невралния гребен, където взаимодействат епидермални фактори и техните антагонисти. Клетките на невралния гребен са плурипотентни и се индуцират чрез активиране на Wnt и инхибиране на BMP (32). Те мигрират между мезодермата, ектодермата и ендодермата и след достигане на целта си се диференцират под влиянието на генетични фактори и фактори на средата. Сигналът на ендотелин-1 (Edn1) определя максило-мандибуларната идентичност на черепния неврален гребен (33). Тези клетки са основен източник на съединителна тъкан, мускули, артерии и ганглии в лицево-челюстната област (34).

До четвъртата гестационна седмица главата на плода съдържа мезенхим, произхождащ от паракснаната мезодерма и черепния неврален гребен чрез епително-мезенхимна трансформация (EMT) (35). След гаструлацията през третата седмица, мезенхимните клетки мигрират и формират ембрионалната мезодерма, която се организира в паракснална мезодерма и по-късно се диференцира в сомити и склеротом. Тези структури, заедно с клетки от невралния гребен, допринасят за формирането на черепните и лицевите кости. Неврокраниумът се развива

от параксиалната мезодерма и невралния гребен, докато висцерокраниумът произлиза изцяло от мезенхима на нервния гребен (36).

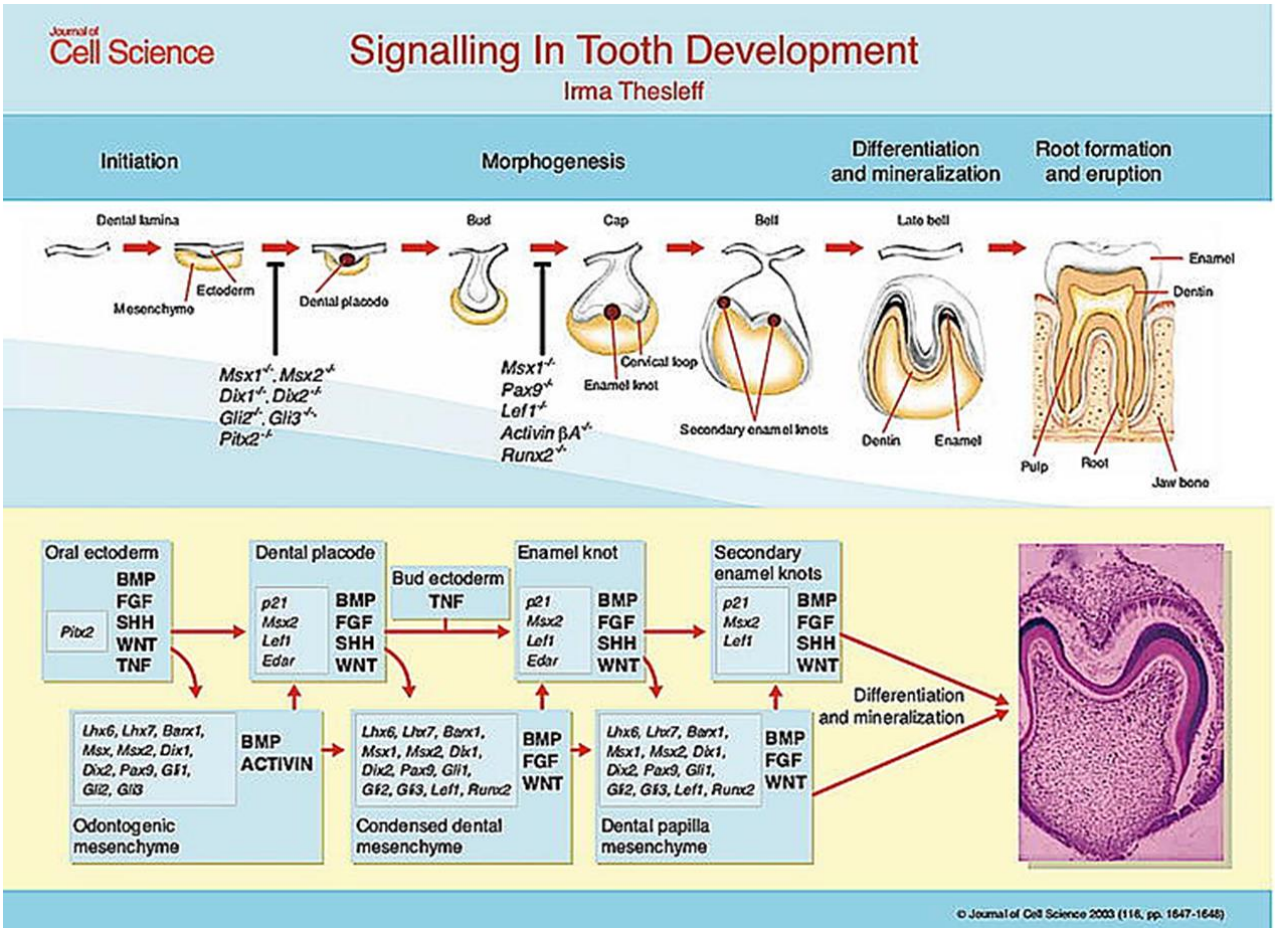
2.2. Зъбна ембриология

Когато ембрионът е на 3½ седмици, примитивната устна кухина или стоматодеумът е свързан отгоре с предния мозък и отдолу от сърдечната изпъкналост. Примитивната устна кухина е облицована от стратифициран сквамозен слой епител, наречен устна ектодерма и е отделен от ендодермата на предстомашието с мембрана, наречена букофарингеална мембрана. Тази мембрана се разкъсва, когато ембрионът е на около 4 седмици, така се установява връзка между стоматодеума и предстомашието. Устната ектодерма е изградена от два до три слоя епител и покрива ембрионалната съединителна тъкан, която е наречена ектомезенхим, поради миграцията на клетките на невралния гребен в него. Ектомезенхимните клетки взаимодействат с надлежащите ектодермални клетки, за да инициират развитието на зъбите (37).

Когато ембрионът е на около 5–6 седмици, определени региони на базалните клетки на оралната ектодерма пролиферират по-бързо от съседните клетки, за да образуват непрекъсната лента от удебелен епител, нахлуващ в подлежащ ектомезенхим. Това се нарича първична епителна лента. Тя има форма на подкова (дъга) и съответства на позицията на бъдещите дентални дъги на горната и долната челюст. Формацията на първичната епителна лента започва в предната част в областта на резците и се разпространява по формата на дъгата латерално. Този процес поражда две подразделения от клетки: първи зъбен лист и вестибуларна ламина малко по-късно, пред зъбната ламина. Зъбната ламина допринася за формиране на ектодермалната част на развиващите се зъби. В някои области на зъбната пластинка, където бъдещите 10 максиларни и 10 мандибуларни временни зъби ще се формират, клетките започват да

пролиферират за да образуват малки кръгли структури, т.нар зъбни плакоди, които изпъкват в основата на ектомезенхима. Тези кръгли епителни издутини образуват емайловите органи на временните зъби (38).

Тези емайлови органи не се развиват едновременно. Първият се появява в антериорната област във всяка арка а останалите се появяват по-късно. Когато емайловия орган се образува, ектомезенхимните клетки пролиферират и това води до кондензация на ектомезенхима. Частта от кондензирания ектомезенхим непосредствено под емайловия орган е зъбната папила, а частта която загражда емайловия орган и зъбната папила е зъбният фоликул или зъбната торбичка. Емайловият орган, зъбната папила и зъбният фоликул представляват зъбния зародиш, от които се получават всички части на зъба и неговата опора структурите. Емайловият орган е предшественик на емайла, от зъбната папила произлиза дентина (коронален и радикуларен) и пулпата, а от зъбния фоликул произлиза цимента, пародонталния лигамент и алвеоларната кост Фигура 1 (39).



Фигура. 1 Клетъчна сигнализация и етапите на ембрионално зъбно развитие (39)

2.2.1. Развитие на емайлов орган на постоянни зъби и съдба на денталната ламина

Зъбната ламина, от която произлиза емайловия орган на временните зъби, претърпява дистално и лингвално разширение, за да започне формирането на емайловите органи на постоянните зъби . Те могат да бъдат класифицирани като такива, които имат предшестващи временни зъби и такива, които нямат предходни временни зъби (40). Постоянните централни и странични резци, кучешки зъби и първи и втори премолари имат аналог при временните зъби и с пиковете на растеж заемат техните места. Докато първият, вторият и третият молари са зъби без предшественици . Този феномен при моларите се дължи на лингвално

разширение на зъбналата пластина, която дава началото на емайла орган на зъби. Първото лингвално удължаване става на 5-ия месец в утробата за постоянния централен резец и последното на 10-тия месец след раждането за втория премолар. Емайловият орган на моларите се развива от дистално разширение на зъбната пластинка, което създава своето залавно място в четвъртия месец в утробата за първи постоянен молар. На първата година след раждането се залавя втория молар и на петата година след раждането се залавя третия молар. Дейността на зъбната пластинка функционира до 5 годишна възраст, след което започва да дегенерира, заради мезенхимната инвазия. Тя губи връзката си с емайловия орган, докато зъбите продължават тяхното развитие (41). Зъбната ламина може да е активна в района на третия молар дори след като започне да дегенерира в другите области (42).

2.2.2. Стадии на развитие

Развитието на зъба може да бъде разделено с няколко стадия, базирани на формата на емайловия орган:

- Пъпковиден стадий
- Шапковиден стадий
- Камбанковиден стадий
- Напреднал камбанковиден стадий

2.2.2.1. Пъпковиден стадий

Зъбната пъпка представлява кълбо от ектодермални клетки, разположени сред мезенхима. В този стадий зъбната пъпъка е еднаква по форма и големина за всички зъби.

2.2.2.1.1 Емайлов орган

Емайловия орган, който прилича на пъпка, се състои от ниски колонни клетки в периферията и многоъгълни клетки в центъра.

В резултат на повишена пролиферация на ектомезенхимни клетки и миграция на клетки на нервния гребен, клетъчната плътност на ектомезенхима в непосредствена близост до емайловия орган се увеличава. Това се нарича кондензация на ектомезенхим (43).

2.2.2.1.2 Дентална / зъбна папила

Кондензираният ектомезенхим непосредствено под емайловия орган е зъбната папила.

2.2.2.1.3 Дентален фоликул

Кондензираният ектомезенхим, обграждащ емайловия орган и зъбната папила оформят зъбния фоликул / торбичка (44).

2.2.2.2 Шапковиден стадий

2.2.2.2.1 Емайлов орган

Емайловият орган се дели неравномерно в различните части. Това води до етап, в който емайловият орган изглежда като шапка.

Клетките на емайловия орган в изпъкналата част на шапкопобната структура са с кубовидна форма и образуват външния емайлов епител, а клетките във вдлъбнатината на шапковидната структура са с колонна форма и образуват вътрешния емайлов епител. Външният емайлов епител е отделен от зъбната торбичка, а вътрешният емайлов епител е отделен от зъбната папила чрез базална мембрана. Външният емайлов епител е отделен от зъбната торбичка, а вътрешният емайлов епител е отделен от зъбната папила чрез базална мембрана. Клетките в центъра на емайловия орган, между външния емайлов епител и вътрешния емайлов епител,

синтезират гликозаминогликани, които се секретират в извънклетъчното пространство между епителните клетки. Тъй като са хидрофилни, тези гликозаминогликани изтеглят вода в емайловия орган от околния ектомезенхим чрез осмотична сила. В резултат на това полигоналните клетки в центъра се раздалечават. Тези клетки стават звездообразни, тъй като продължават да поддържат контакт една с друга заради своите цитоплазмени взаимодействия. Звездовидните клетки образуват разклонена клетъчна мрежа, наречена звездовиден ретикулум. Мукоидната течност, която се събира между клетките на звездовидния ретикулум, е богата на албумин и му придава консистенция, която има протективна функция и поддържа клетките за образуващия се емайл (45).

2.2.2.2.2 Преходни структури

Клетките в центъра на вдлъбнатината на „шапката“ на емайловия орган са плътно опаковани и образуват разширение, стърчащо към подлежащата зъбна папила. Тази структура се нарича първичен емайлов възел. Той действа като център, където се протича клетъчното делене, което води до морфогенезата на зъба.

Вертикално разширение на емайловия възел, минаващо през центъра на емайловия орган, се нарича емайлова връв. Когато това разширение се срещне с външния емайлов епител, се нарича емайлова преграда. Малката депресия, която се образува на кръстопътя между емайловата преграда и външния емайлов епител, се нарича емайлов пъп. Това са преходни структури, които изчезват преди да започне образуването на емайла (46).

Емайловите възли играят жизненоважна роля за успешното формиране на зъбите. Проучванията за нокаут на гени разкриват, че развитието на зъбите е спряно, ако има проблем при образуването на първичния емайлов възел. Вторичните възли на емайла се образуват по

време на камбанковидния стадии на мястото на бъдещите туберкули и играят централна роля в насочването на морфогенезата при мултикуспидални зъби. Разликите в местоположението на вторичните възли съответстват на разликите в позиционирането на ръба. Промените в генната експресия или сигналните протеини могат да доведат до аномална морфология на зъбите. Дори леки промени, засягащи времето и позиционирането на вторичния емайлов възел, могат да доведат до видими и количествено измерими вариации в крайната морфология на короната (47).

2.2.2.2.3 Дентална / зъбна папила

Заедно с развитието на емайловия орган, клетките на зъбната папила започват своята пролиферация. В нея започва ангиогенеза. Това се вижда от наличието на митотични фигури и активното пъпкуване на капилярите (48).

2.2.2.2.4 Дентален / зъбен сак

Зъбната торбичка изглежда по-уплътнена и фиброзна

2.2.2.3 Камбанковиден стадий

2.2.2.3.1 Емайлов орган

Тъй като емайловият орган се инвагинира допълнително с растеж по ръбовете, той приема формата на камбана. В този стадий короната на зъба придобива окончателната си форма (морфодиференциация) и клетките, които образуват твърдите тъкани на короната (амелобластите, които образуват емайла и одонтобластите, които формират дентина), се диференциират (49).

На този етап могат да бъдат идентифицирани четири различни типа епителни клетки на емайловия орган (50):

1. Вътрешен емайлов епител

2. Междинен слой

3. Стелатен/звездовиден ретикулум

4. Външен емайлов епител

Връзката между вътрешния и външния емайлов епител е известна като зона на рефлексия или цервикална бримка.

1. Вътрешен емайлов епител: Изграден е от единичен слой цилиндрични клетки, свързани помежду си с десмозоми. В процеса на амелогенеза, те се диференцират в амелобласти

2. Междинен слой: Образува се от сквамозни клетки, разположени между вътрешния емайлов епител и стелатния ретикулум. В тях се наблюдават умерен брой митохондрии, снопове от нишки, добре развит апарат на Голджи, множество рибозоми, тонофиламенти, киселинни мукополизахариди и гликогенови отлагания. Клетките на междинния слой участват в синтеза на протеини и транспортирането на хранителни вещества до амелобластите и имат висока активност на ензимната алкална фосфатаза. Този слой играе важна роля в регулирането на образуването на емайла.

3. Стелатен ретикулум: Тези звездообразни клетки са свързани една с друга и с клетките на външния емайлов епител и stratum intermedium от десмозоми. Те служат за защита на епителните клетки на вътрешния емайл. След като се постави слой дентин, вътрешните емайлови епителни клетки са лишени от хранителния си запас от зъбната папила. Стелатният ретикулум се свива преди образуването на емайла, приближавайки капилярите в зъбния фоликул по-близо до епителните клетки на вътрешния емайл, за да осигурят хранене. Колапсът на стелатния ретикулум не е едновременен и не настъпва напълно, а започва от най-

дълбоката точка на инвагинация на емайловия орган и прогресира цервикално. Колабиралият стелатен ретикулум не може да се разграничи от междинния слой.

4. Външен емайлов епител - има кубовидни клетки. Те са свързани със съседните клетки чрез връзка комплекси. Външният емайлов епителен слой е гладък в началните етапи. Тъй като стелатният ретикулум се свива преди образуването на емайла, този слой се поставя в гънки, приближавайки капилярите, присъстващи в зъбния фоликул, по-близо до амелобластите (50).

2.2.2.3.2 Зъбна папила

Финитe фибрили от базалната ламина, която отделя зъбната папила от емайловия орган, се простират в ацелуларна зона. Ацелуларната зона присъства между базалната ламина и зъбната папила и е лишена от клетки. Извънклетъчното пространство е заето от няколко фини, разпръснати колагенови фибрили. Клетките на зъбната папила са недиференцирани мезенхимни клетки, съдържащи обичайните органели. Периферно разположените недиференцирани ектомезенхимни клетки на зъбната папила увеличават размера си преди да започне образуването на емайла. Първоначално те са кубовидни, а по-късно стават колонни и се диференцират в одонтобласти. Това увеличаване на размера на най-външните клетки на зъбната папила елиминира ацелуларната зона между зъбната папила и вътрешния емайлов епител. Експериментално е установено, че диференцирането на недиференцираните ектомезенхимни клетки на зъбната папила се осъществява под влияние на клетките на вътрешния емайлов епител. При отсъствието на епителните клетки на вътрешния емайл не настъпва диференциация на одонтобластите и не се образува дентин. Базалната мембрана, която разделя органа на емайла и

зъбната папила непосредствено преди образуването на дентина, се нарича membrana preformativa (51).

2.2.2.3.3 Зъбен фоликул

Тъй като все повече колагенови фибрили заемат извънклетъчните пространства между фибробластите на зъбния фоликул, те могат ясно да се разграничат от по-кръвоснабдени зъбни папили. Тези колагенови фибрилите се ориентират кръгово около емайловия орган и зъбните папили. Именно тези влакна на зъбния фоликул по-късно се диференцират в периодонтални влакна, които се вграждат в цимента и алвеоларната кост (52).

2.2.2.3.4 Определяне на формата на короната

Другите събития, които се случват по време на камбанковидния стадии, са разрушаването на зъбната ламина и определянето на модела на короната на зъба (морфодиференциация) (53). По време на този стадии, зъбната ламина, която присъединява емайловия орган към оралната ектодерма, се инвазира от околните клетки на зъбния фоликул (54). Той претърпява фрагментация, което води до отделяне на емайловия орган от оралната ектодерма. Клъстери от епителни клетки, които обикновено дегенерират, се образуват след фрагментирането на зъбната ламина (55). Клетките, които продължават да се делят образуват епителни острови. Понякога върху развиващия се зъб от тези остатъци от клетки се образуват кисти, които забавят зъбния пробив. Вече беше отбелязано, че преходът на емайловият орган от шапковиден до камбанковиден стадии се дължи на инвагинацията на вътрешния слой на емайловия орган и растежа на емайловия орган в неговите краища (56). Допълнителна инвагинация или нагъване на вътрешния слой на емайловия орган (вътрешен емайлов епител) определя формата на короната на зъба. По-рано се е смятало, че

нагъването на емайловия орган се получава в резултат на натиска, упражняван от пролифериращите клетки на зъбната папила върху вътрешния емайлов епител (57). Сега проучванията показват, че на това налягане се противопоставя течността, присъстваща в стелатния ретикулум. Нагъването, което придава форма на короната, възниква в резултат на различните скорости на митотично делене на клетките от вътрешния емайлов епител, както и на разликата във времето, в което тези клетки претърпяват диференциация (58). Клетките започват да се диференцират, след като спрат да се делят. Тези вътрешни епителни клетки на емайла, които се намират в областта на бъдещия туберкул или режещ ръб, спират да се делят по-рано и започват да се диференцират първи, за да поемат своята функция за производство на емайл. Тази точка, в която първа започва диференциацията на епителните клетки на вътрешния емайл, е известна като център на растеж (59). Докато тези клетки на върха на туберкула претърпяват диференциация и спират да се делят, другите клетки на емайловия орган продължават да се делят, упражнявайки натиск върху клетките в областта на върха на туберкула или режещия ръб. Това води до изтласкване на клетките в областта на върха на емайла нагоре в емайловия орган към външния емайлов епител (60). Клетките в друга бъдеща зона на туберкул започват да се диференцират и образуват върха на туберкула чрез подобен процес. Постепенно останалата част от клетките на вътрешния емайлов епител от страната на растежния център престават да се делят и претърпяват диференциация . Този процес определя формата на зоната между двата върха на зъбците, които са степента на наклоните на зъбците и височината на коронковата част. Клетъчната диференциация протича цервикално и клетките в цервикалната бримка са последните, които се диференцират. По този начин се определя формата на короната (61).

2.2.2.4 Напреднал камбанковиден стадии

Напредналият камбанковиден стадий се характеризира с началото на минерализация и образуване на корени.

2.2.2.4.1 Минерализация

Периферните ектомезенхимни клетки на зъбната папила се диференцират в одонтобласти под влияние на епителните клетки на вътрешния емайл. Линията, разделяща новодиференцираните одонтобласти и епителните клетки на вътрешния емайл, очертава емайло-дентиновата граница (62). Тъй като одонтобластите започват да се диференцират, те изработват органичната матрица на дентина по протежение на емайло-дентиновата граница, първоначално в областта на бъдещия ръб. Този матрикс продължава пулпално и апикално и минерализира по-късно. След като се образува първият слой дентин, късите колоновидни епителни клетки на вътрешния емайл се удължават, за да станат с по изразена колоновидна форма, която променя тяхната полярност (подравняване на ядрата в съседство с междинния слой и комплекса на Голджи, обърнат към зъбната папила) и стават функционални амелобласти (63). Тези амелобласти произвеждат органична матрица от емайл срещу новообразувания дентин. Почти веднага тази органична матрица се минерализира, за да се превърне в началния слой на емайла. Тъй като образуването на емайла продължава от дентино-емайловото съединение към външната повърхност, амелобластите се отдалечават от дентина коронално и цервикално(64).

2.2.2.4.2 Реципрочна индукция

Важна стъпка в развитието на зъба е крайната диференциация на амелобластите и одонтобластите и образуването на две основни твърди тъкани на зъба: емайл и дентин. Това е процесът на хистодиференциация.

Експериментите показват, че диференциацията на одонтобластите от периферните ектомезенхимни клетки на зъбната папила става под въздействието на епителните клетки на вътрешния емайл и на свой ред тези вътрешни емайлови епителни клетки се диференцират във функционални амелобласти, единичен слой от дентинова матрица, положен от одонтобластите, е от съществено значение. Диференциацията на амелобластите и одонтобластите е взаимозависима и това е пример за реципрочна индукция (65).

2.2.2.5 Епителна коренова обвивка на Hertwig и образуване на корен

Образуването на емайла и дентина протича, очертавайки дентино-емайловото съединение. Когато тази линия достигне бъдещото циментово-емайлово съединение, започва развитието на корена. От цервикалната част на емайловия орган възниква епителна коренова обвивка на Hertwig (HERS), която играе важна роля при определянето на формата, дължината, размера и броя на корените (66). В допълнение, той инициира образуването на радикуларен дентин. Епителната коренова обвивка на Hertwig, възникваща от цервикалната част на емайловия орган, е двоен слой от клетки, съставен само от вътрешен и външен емайлов епител. Тази обвивка се простира около зъбната папила и я отделя от околния зъбен фоликул навсякъде, с изключение на базалната част (67). Клетките на вътрешния емайлов епителен слой на HERS влияят върху образуването на слой одонтобласти от най-външната част на радикуларната зъбна папила. Този слой от одонтобласти поставя първия слой радикуларен дентин. Това се случва подобно на начина, по който коронарният дентин се образува под въздействието на вътрешния емайлов епител на емайловия орган (68). В частта на короната клетките на вътрешния емайлов епител стават функционални амелобласти, като стават по-високи и образуват емайл след

образуването на един слой дентин. За разлика от тях, в кореновата част, клетките на вътрешния емайлов епител на HERS остават къси и не произвеждат емайл. След образуването на първия слой радикуларен дентин, HERS губи своята непрекъснатост и в същото време клетките на зъбния фоликул/торбичка пролиферират и нахлуват в двойния слой на HERS, разделяйки го на епителни нишки (69). По този начин епителната обвивка на корена се отдалечава, което позволява на клетките на съединителната тъкан на зъбния фоликул да влязат в контакт с повърхността на новообразувания радикуларен дентин. Това води до диференциацията клетките на зъбния фоликул в цементобласти, които отлагат цимент върху повърхността на радикуларния дентин. По същия начин фибробластите и остеобластите се диференцират от клетките на зъбния фоликул, образувайки съответно периодонталния лигамент и алвеоларната кост (70). Повечето от клетките на HERS се отстраняват след нахлуването на клетките на зъбния фоликул, но на някои места се откриват остатъци от тях. Тези остатъци се наричат клетъчни остатъци от Malassez и те могат да бъдат намерени като нишки или бучки от епителни клетки в периодонталния лигамент на изникнали зъби. Развитието на HERS при зъби с един корен и при тези с два или три корена е различно (71).

2.2.2.5.1 Образуване на еднокоренов зъб

Външният и вътрешен емайлов епителен слой на HERS се огъват в бъдещата циментово-емайлова връзка върху хоризонтална равнина, преди да започне образуването на корена. Това образува епителната диафрагма, чиято равнина остава относително фиксирана по време на по-нататъшното развитие и растеж на корена (72). Диафрагмата стеснява широкия шиен отвор на зъбен зародиш и обхваща първичния апикален отвор. Когато клетките на епителната диафрагма пролиферират, човек може да очаква да види свободния край на диафрагмата да расте в съединителната тъкан,

причинявайки допълнително стесняване на цервикалния отвор на зъбния зародиш. Но пролиферацията на клетките на епителната диафрагма е придружена от пролиферацията на клетките на съединителната тъкан на зъбната папила, съседна на диафрагмата. В резултат на това се получава удължаване на обвивката на корена (коронарна до епителна диафрагма) и не се получава стесняване на цервикалния отвор (73). Въпреки че има удължаване на HERS с началото на образуването на корен, кореновата обвивка всъщност не расте в челюстта. Това е короната на зъба, която се отдалечава от костната основа на криптата. С увеличаването на дължината на обвивката на корена се образува повече корен с образуването на цимент, периодонтален лигамент и алвеоларна кост, както беше описано по-рано. HERS не се разглежда като непрекъснат слой върху повърхността на корена поради бързата последователност на неговата пролиферация и унищожаване (74). По време на последните етапи от развитието на корена, пролиферацията на клетките на епителната диафрагма (HERS) изостава от тази на клетките на зъбната папила. Това стеснява цервикалния отвор, който допълнително се стеснява от отлагането на дентин и цимент. По този начин апикалната трета на корена става конична (75).

2.2.2.5.2 Образуване на многокоренов зъб

При многокоренови зъби се развиват езиковидни разширения върху хоризонталната диафрагма поради диференциалния растеж на диафрагмата. Зъбните зародиши на долните молари имат две такива разширения, а тези на горните молари имат три такива разширения, чиито свободни краища растат един към друг и се сливат. Единичният цервикален отвор (първичен апикален отвор) на зъбния зародиш е разделен на два или три отвора (вторични апикален отвор). Образуването на дентин започва от пулпозната страна на тези епителни мостове. Оформянето на

корена следва същия начин, както е описано за еднокоренови зъби по периферията на всеки отвор (76).

2.2.2.5.3 Аберация в HERS

Клетките на HERS могат да се диференцират в напълно функционални амелобласти и да образуват емайл, ако останат прилепнали към радикуларния дентин, без да бъдат отстранени от нахлуващите клетки на зъбния фоликул. Това може да се появи като глобула от емайл, наречена перла на емайла, и понякога се вижда в областта на фуркацията на корените на първите постоянни молари (77). Това кълбо от емайл може да доведе до пародонтални проблеми. Възниква дефект в дентиновата стена на пулпата, ако непрекъснатостта на HERS е нарушена преди образуването на радикуларен дентин и това води до образуването на допълнителни коренови канали. Подобен тип дефекти могат да възникнат и когато има аберации в разцепването на първичния апикален отвор, което води до развитие на допълнителни корени (78). Допълнителните коренови канали и допълнителните корени могат да доведат до неуспех на ендодонтската терапия, ако бъдат оставени незабелязани. Изкривяването на HERS поради травма или натиск може да доведе до ъглови корени, които създават трудности по време на екстракция. Това рязко извиване в корена на зъба се нарича дилацерация. Съединението на зъбния корен само с цимента се нарича конкресценция. Това се дължи на прекомерно отлагане на цимент. Такова събитие създава трудности по време на извличане (79).

2.2.2.6 Развитие на зъб: хистофизиологичен процес

Досега развитието на зъба е разглеждано въз основа на формата на емайловия орган в отделните етапи на развитие. Въз основа на протичащия хистофизиологичен процес, развитието на зъба може да се проследи по следните процеси:

1. Инициация

2. Пролиферация

3. Хистодиференциация

4. Морфодиференциация

5. Апозиция

Въпреки че всеки от гореспоменатите процеси преобладава в единия етап повече от другия, те значително се припокриват.

Инициация

Началото на развитието на зъбите зависи от епително-ектомезенхимното взаимодействие. Зъбната ламина, която се образува в резултат на това взаимодействие, има способността да образува емайлови органи на временни и постоянни зъби. Липсата на такова взаимодействие води до липса на зъб, състояние, наречено анодонтия (80). Това може да включва един зъб или множество зъби (олигодонтия) или цялото съзъбие (пълна анодонтия). Зъбите, които обикновено липсват, са горните странични резци, третите молари и долните втори премолари. Обратно, анормалното започване може да доведе до образуването на единични или множество излишни зъби. Най-често срещаните допълнителни зъби са mesiodens (между два горни централни резеца) и paramolars (отстрани на кътниците) (81). По същия начин аберацията в началото може да доведе до развитие на зъба на необичайни места (яйчник).

Пролиферация

Органът на емайла, образуван в резултат на инициирането, претърпява пролиферация, за да придаде на короната на зъба окончателния си размер и форма. Всяко смущение в пролиферацията ще има ефект върху

развитието на зъба в зависимост от етапа, в който възниква смущението (82).

Хистодиференциация

Тъй като клетките продължават да се делят, те претърпяват промени (структурни, биохимични и т.н.) и се подготвят да изпълняват функцията си, например отлагане на органична матрица (апозиция). Този процес е известен като хистодиференциация . В него клетките могат да се откажат от някои от свойствата, които са притежавали по-рано, като например способността им да се делят. Хистодиференциацията се наблюдава в етапа на камбаната точно преди образуването и поставянето на емайла и дентина. В етап камбана, вътрешният емайловият епител влияе върху съседните клетки на зъбната папила да се диференцират в одонтобласти, които образуват матрицата на дентина. Това представлява хистодиференциацията на одонтобластите. След това вътрешните емайлови епителни клетки се диференцират в амелобласти, които образуват емайловата матрица. Това представлява хистодиференциацията на амелобластите (83). Образуването на емайла и дентина е взаимнозависим процес. Когато има дефицит на витамин А, амелобластите не успяват да се диференцират правилно и оттам се нарушава техния контрол върху съседните клетки на зъбната папила. В резултат на това одонтобластите не успяват да се диференцират правилно и дентинът, образуван от тези одонтобласти, ще бъде нетипичен и е известен като остеодентин (84).

Морфодиференциация

Морфологичната форма и формата на зъба се определят от морфодиференциация или диференциален растеж. Дентино-емайловото съединение и дентино-цементното съединение са характерни за различните

зъби и определят формата съответно на коронката и корена. Дентино-емайловото съединение и дентиноцементното съединение се установяват преди образуването на твърдата тъкан (85). В съответствие с формата си формиращите клетки отлагат емайл, дентин и цимент, придавайки на зъба характерната форма и размер (86). Нарушенията, възникващи по време на морфодиференциацията, могат да повлияят на морфологията на короната или корена в зависимост от етапа, на който възниква нарушението. Образуването на излишен корен и дилацерация (анормално изкривяване на корена, причинено от травма) са някои примери за смущения, включващи морфологията на корена (87).

Апозиция

Апозицията е отлагането на матрицата от твърди зъбни тъкани, характеризиращо се с редуване на периоди на активност и почивка (88). Именно този правилен и ритмичен апозиционен растеж придава окончателната форма на зъба. Прилагането включва образуване на органичната матрица и нейното последващо калцифициране или минерализация (89). Хипоплазия е терминът, използван за обозначаване на смущения, включващи образуването на матрикса, докато хипокалцификацията или хипоминерализацията показват смущения, включващи калцификацията или минерализацията на матрикса. Различни генетични фактори и фактори на околната среда могат да причинят смущения в образуването на матрицата на емайла, водещи до хипоплазия на емайла (90).

2.2.2.7 Молекулярни аспекти на развитието на зъбите

Инициация

Спрямо литературни данни, одонтогенезата се инициира от фактори, намиращи се в първия арков епител, влияещи върху ектомезенхима, но с

времето този потенциал се поема от ектомезенхима (91-93). Тези експериментални находки са подкрепени от модела на експресия на растежни и транскрипционни фактори в тези тъкани. Растежен фактор, FGF-8 (фибробластен растежен фактор), се експресира на правилното място и време в първия бранхиален епител на дъгата и това индуцира експресията на транскрипционни фактори като Lh-6 и Lh-7 (Lim home-box домейн гени) в невралния гребен, получен първи архектомезенхим (94-96).

Позициониране на зъбните зародиши

Много фактори контролират разположението на зъбните зародиши по устната повърхност. Експерименталните данни показват, че сигналът за локализиране на зъбните зародиши изглежда произхожда от оралния епител. FGF-8, експресиран в оралния епител, играе роля в инициирането на развитието на зъбите и определянето на позицията, в която ще се формират зъбните зародиши. Това се прави чрез индуциране на експресията на гена Pax-9 (сдвоен хомоеротичен ген) в мезенхима (97). Експресията на гена Pax-9 в мезенхима съвпада с точното място, където ще се появят зъбните зародиши. Заедно с FGF-8, някои протеини като BMP-2 и BMP-4 (костен морфогенетичен протеин) също се експресират в оралния епител в области, които не се припокриват. BMP-2 и BMP-4 имат потискащ ефект върху генната експресия на Pax-9. Така че Pax-9 генът ще се експресира в области, където FGF-8 се експресира в оралния епител и няма да се експресира в области, където BMP-2 и BMP-4 се експресират в оралния епител (98,99).

2.3 Стволови клетки

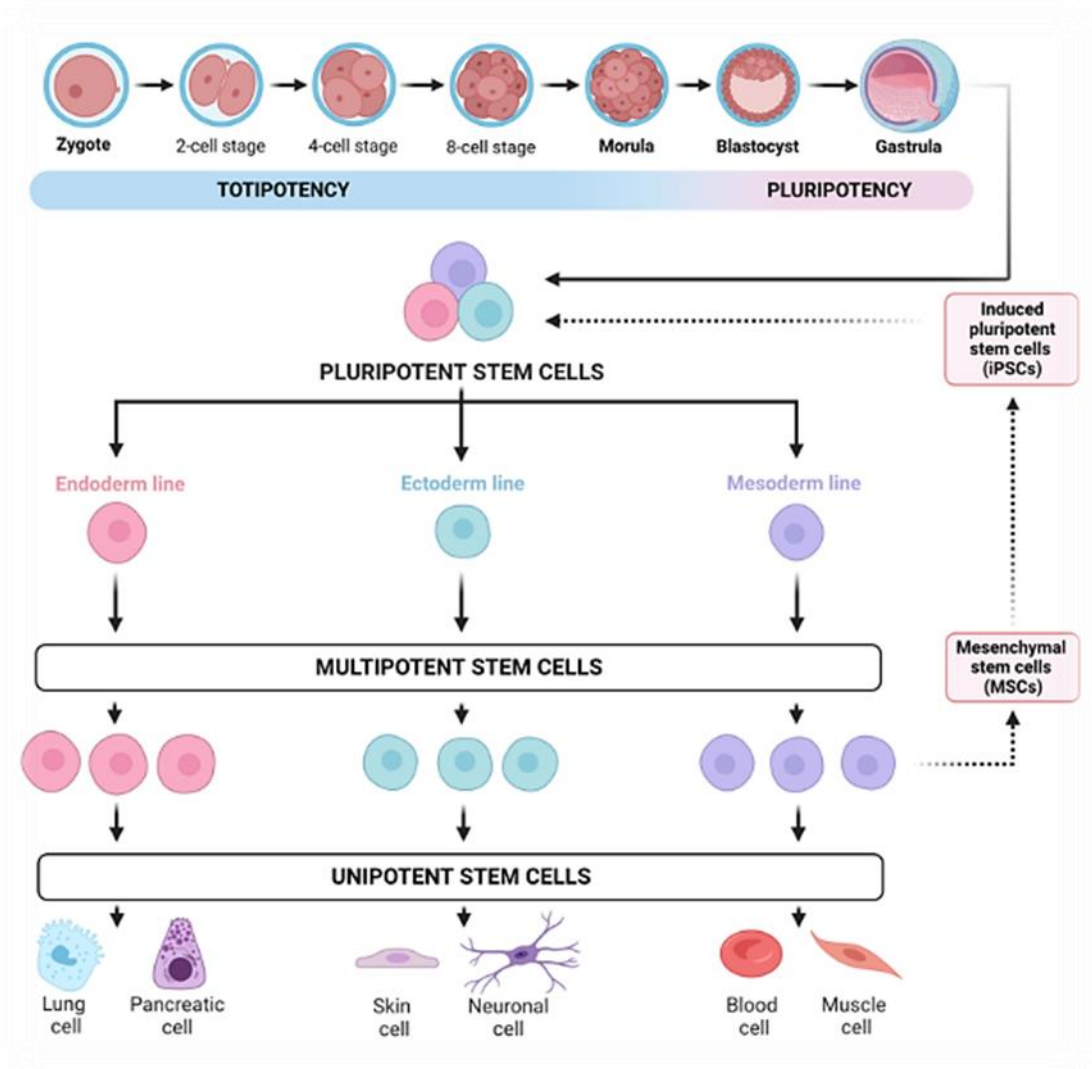
Изследванията на стволови клетки са започнали още през 50-те години на миналия век, когато са проведени различни експерименти с костен мозък, за да се докаже техният регенеративен потенциал (100).

Екипът от учени от университета в Мадисън първи изолира човешки ембрионални стволови клетки в лаборатория. Тези изолирани стволови клетки, които запазват способността си да се трансформират в различни видове клетки, включително костни, хрущялни, нервни и мускулни клетки (101).

Стволовите клетки притежават уникални характеристики, включително способността да се самообновяват чрез клетъчно делене и потенциала да се диференцират в специализирани видове клетки при специфични физиологични условия. Тези отличителни характеристики отличават стволовите клетки от другите видове клетки (102). Стволовите клетки се категоризират в три основни типа въз основа на тяхната ефективност: ембрионални стволови клетки, индуцирани плурипотентни стволови клетки и възрастни стволови клетки (103).

Сред тях ембрионалните стволови клетки, получени от ембрионалните зародишни слоеве, проявяват висока плурипотентност и потенциал за диференциация както in vitro, така и in vivo. Тази гъвкавост ги позиционира като основен източник за регенерация на тъкани и обещава в регенеративната медицина, като предлага потенциални лечения за състояния като болестта на Паркинсон, сърдечни заболявания и диабет (104, 105).

Стволовите клетки обикновено са недиференцирани клетки в човешкото тяло. Те могат да се делят, диференцират и специализират при определени условия във всеки тип клетки, съответстващи на всеки орган в човешкото тяло. Те съществуват както в ембрионалния, така и във възрастния организъм. Пътят към специализацията е многоетапен (106). Фигура 2 създадена от BioRender.com.



Фигура 2. Стволови клетки разделени по видове спрямо тяхната способност за диференциация. Те се разделят на Тотипотентни, Плурипотентни, Мултипотентни, олигопотентни и Унипотентни.

- Тотипотентните стволови клетки могат да се делят и диференцират в различни клетки в целия организъм. Те имат най-висок потенциал за диференциация, което им позволява да създават както ембрионални, така и екстраембрионални структури. Пример за тотипотентни клетки е зиготата. Тези клетки могат впоследствие да образуват трите зародишни слоя или плацентата. След 4 дни ембрионално развитие вътрешната клетъчна маса на бластоциста става източник на плурипотентни стволови клетки (107).

- Плурипотентните стволови клетки (PSC) участват във формирането на всички зародишни слоеве, но не допринасят за формирането на екстраембрионални структури. Ембриоталните стволови клетки (ESCs) произхождат от вътрешната клетъчна маса на предимплантационния ембрион, докато индуцираните плурипотентни стволови клетки (iPSCs) произхождат от епибластния слой на имплантирания ембрион. Много изследвания се фокусират върху разбирането на механизмите на iPSCs, насочени към изкуствено препрограмиране/програмиране от соматични клетки (108).
- Мултипотентните стволови клетки имат много по-ограничен потенциал за диференциация в сравнение с PSC, но имат способността да се специализират тясно в линията на стволовите клетки, към която принадлежат. Примерите включват хематопоетични стволови клетки, които могат да се специализират в различни видове кръвни клетки. Някои видове мултипотентни стволови клетки обаче имат способността да се превръщат в несвързани типове клетки (109).
- Олигопотентните стволови клетки могат да се диференцират в няколко вида стволови клетки. Например миелоидните стволови клетки могат да се диференцират в бели кръвни клетки, но не и в червени кръвни клетки (110).
- Унипотентните стволови клетки се характеризират с клетъчна специализация само в един тип клетки, като дермални клетки (111).

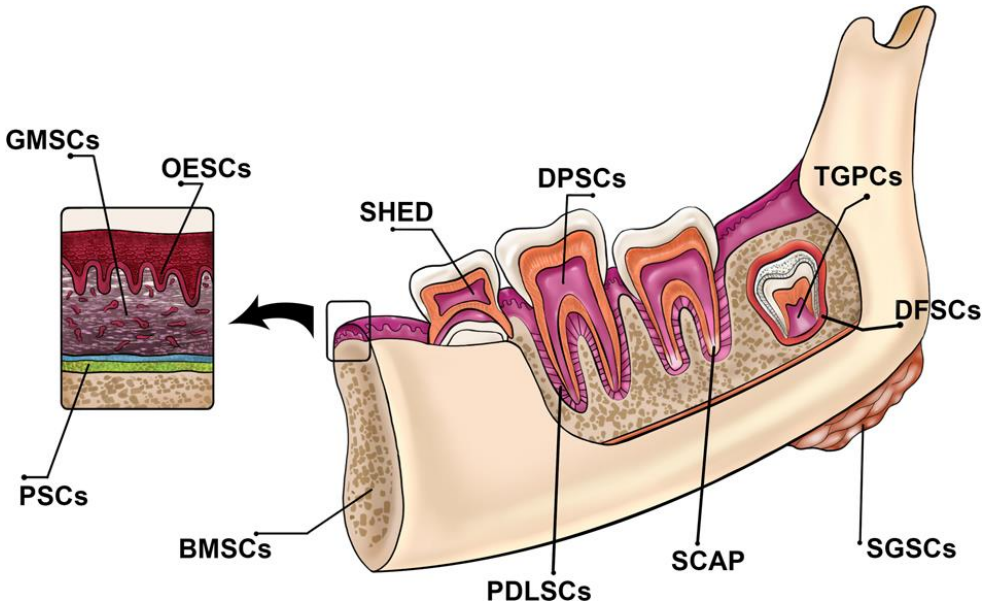
За да се справят с това предизвикателство, изследователите са започнали да изолират стволови клетки от устната кухина. Тези стволови клетки попадат в категории като мезенхимни стволови клетки (MSCs), възрастни стволови клетки (ASCs) и тъканни стволови клетки (TSCs). Сред тях, MSC са особено ценени заради тяхната забележителна пластичност, запазвайки потенциала да се диференцират в множество клетъчни линии,

когато се култивират в колонии (112). Първите мезенхимни стволови клетки, изолирани от устната кухина, са стволови клетки от зъбна пулпа (DPSC). Оттогава стволовите клетки са извлечени от различни области на устната кухина с помощта на различни методи и са диференцирани в различни типове клетки (113).

2.4 Стволови клетки от зъбен произход

Устната кухина е богат резервоар от разнообразни тъканни източници, от които могат да бъдат изолирани стволови клетки, включително периодонтален лигамент, апикална папила, алвеоларна кост, тъкан от зъбна пулпа, максиларен синус, гранулационна тъкан на периодонтален лигамент и гингива. След изолирането на стволови клетки следват процеси на диференциация, ръководени от различни маркери и методологии, водещи до генериране на остеобласти, одонтобласти, цементобласти, хондробласти, хондроцити, адипоцити, невробласти, ангиобласти и фибробласти (114). Стволовите клетки, основополагащи за усилията на тъканното инженерство, са недиференцирани клетки, преобладаващи в почти всички тъкани, способни както на самообновяване, така и на диференциация в безброй видове клетки. В рамките на зрелия пародонт множество видове клетки, като цементобласти, остеобласти, фибробласти, ендотелни клетки, нервни клетки и епителни клетки, демонстрират подобни на стволови свойства (115). Първоначално идентифицирана в костния мозък, където се намират хематопоетични стволови клетки и мезенхимни стволови клетки, устната кухина се очертава като значителен източник на мезенхимни стволови клетки, разпределени в добре охарактеризирани тъкани (116). Изолирани са различни типове зъбни стволови клетки, включително стволови клетки от зъбна пулпа (DPSC), стволови клетки от ексфолирани млечни зъби (SHED), стволови клетки от пародонтален лигамент (PDLSC), стволови

клетки от апикална папила (SCAP), стволови клетки от зъбен фоликул (DFSC), гингивални фибробластни стволови клетки (GFSC) и стволови клетки от букална мастна подложка (BFPSC). Зъбните мезенхимни стволови клетки допринасят значително за поддържането и възстановяването на свързаните тъкани, предлагайки различни предимства пред получените от костен мозък двойници поради произхода им от нервния гребен по време на ембрионалното развитие и техния афинитет към одонтогенна диференциация. Фигура 3 (115).



Фигура 3. Стволови клетки от орален произход
PSC - Плурипотентните стволови клетки
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
DFSC - Зъбни фоликулни стволови клетки
GMSC - Гингивални мезенхимни стволови клетки

MSC, открити в устната кухина, играят решаваща роля в поддържането и възстановяването на свързаните тъкани. Докато зъбните MSCs споделят някои характеристики с BMSCs, както доказват от Pittenger

et al., те проявяват разлики в неврогенния потенциал поради техния произход от нервния гребен по време на ембрионалното развитие (117). Зъбната мезенхимна тъкан, известна още като "ектомезенхим", взаимодейства с нервния гребен. Освен това, зъбните MSCs показват по-голяма ангажираност към одонтогенното, а не към остеогенното развитие. Това предпочитание се приписва на „паметта“, запазена от MSCs, получени от специфични тъкани, което води до тъканно-специфични свойства, повлияни от тяхната нишова среда (118). Според Международното общество за клетъчна терапия, зъбните MSC показват пластична адхезия и са положителни за CD90, CD105, CD73 и CD44, докато са отрицателни за хематопоетични маркери CD34, CD38, CD45 и CD54. Те имат способността да се диференцират в остеобласти, хондробласти и адипоцити (119).

2.4.1 Стволови клетки от зъбна пулпа

Зъбната пулпа се очертава като втората най-използвана тъкан за изолиране, главно поради изобилието от стволови клетки (DPSC). Първоначално изолирани от Gronthos и колеги 2000 г (9), DPSC показват забележителна гъвкавост, диференцирайки се в адипоцити и неврални клетки при благоприятни условия на растеж. Те са източник на различни видове клетки, които са от решаващо значение за регенерацията на тъканите, включително одонтобласти, остеобласти, невробласти, ангиобласти, адипоцити и хондроцити.

Въпреки това през 2005 г. някои изследователи, като Shi et al проявяват съмнение по отношение на ефикасността на тези стволовите клетки при регенерацията на зъбната тъкан (120).

DPSCs проявяват типичните свойства на мезенхимните стволови клетки (MSC), включително многолинейна диференциация, бърза пролиферация и имуномодулаторни функции. Техният неврогенен

потенциал произтича от техния произход от невралния гребен, докато се намират в периваскуларна ниша в постналната зъбна пулпа(121) . По-специално, те допринасят за ангиогенезата in vivo, улеснена от тяхната диференциация в ендотелни клетки и участието им в производството на съдов ендотелен растежен фактор (VEGF) (122).

Клиничните приложения на DPSC са обещаващи, с проучвания, демонстриращи регенерирането на васкуларизирани комплекси, подобни на дентин-пулпа, в пространствата на кореновите канали и успешна реконструкция на тъканите на пулпата в травматизирани зъби. Трябва да се отбележи, че DPSCs са използвани в рандомизирани клинични проучвания, което води до триизмерна регенерация на тъканите на зъбната пулпа, включително одонтобластни слоеве, съединителни тъкани, кръвоносни съдове и невронни маркери (123).

Освен това, DPSC показват уникален капацитет да се диференцират в одонтобласти за възстановяване на дентина, както се вижда от in vivo проучвания за трансплантация (124). Сравнителни анализи с получени от костен мозък MSCs (BMSCs) показват превъзходна активност на алкална фосфатаза и потенциал за минерализация в DPSCs, което показва тяхната пригодност за остеогенни приложения (125). Въпреки че техният капацитет за образуване на цимент повдига въпроси за периодонталната регенерация, изследванията на синтетичното скеле показват обещание за лечение на костни дефекти, като DPSC насърчават ранното образуване на нова кост в предклинични животински модели (126).

2.4.2 Стволови клетки от временни зъби

SHED, подобно на DPSC, произхождат от зъбната пулпа. Въпреки това, SHED показват по-високи нива на експресия на гени, свързани със стволово клетъчния им характер (OCT4, SOX2, NANOG и REX-1) в

сравнение с DPSC поради различия в развитието между млечните и постоянните зъби (127). Тази по-висока пластичност се запазва дори чрез множество пасажи in vitro. SHED демонстрират стабилна възможност за пролиферация и притежават способността да се диференцират в различни клетъчни линии, включително невронни клетки, остеобласти, хондроцити и адипоцити. Докато SHED може да се диференцира в одонтобласти, тяхната репаративна ефикасност може да бъде по-ниска от тази на получените от DPSC одонтобласти (128). Те могат да образуват подобна на дентин или пулпа тъкан, но не и комплекса дентин-пулпа, освен ако не се комбинират с колаген I и не се инжектират в човешки коренови канали. SHED може да произхожда от периваскуларни клетки с перицитоподобни характеристики и да проявява потенциал за ендотелна диференциация, насърчавайки васкуларизацията. Проучванията in vivo показват, че трансплантираният SHED може да образува функционални съдови структури (129). Освен това, SHED, поддържани при остеогенни условия, показват значително повишени проангиогенненни възможности, секретиращи проангиогенни фактори за първични ендотелни клетки. Изследвайки техния остеоиндуктивен потенциал, SHED успешно поправят дефекти на калварията с критичен размер, като се наблюдава ефективно образуване на кост (130). Култивирането на SHED в хитозанови скелети, съдържащи двувалентни метални фосфати, допълнително засилва тяхната остеобластна диференциация в сравнение с култури без двувалентни метални фосфати (131).

2.4.3 Стволови клетки от периодонтален лигамент

PDLSCs, получени от зрели пародонтални връзки, проявяват свойства на стволови клетки, подобни на MSCs, а не на клетките на нервния гребен. Разположени в периваскуларната стена на периодонталните връзки, PDLSC споделят морфологични,

диференциационни и клетъчно-фенотипни прилики с перицитите и демонстрират способност да образуват капилярни структури in vitro. Те пораждат различни видове клетки, включително остеобласти, одонтобласти, хондробласти, адипоцити, хондроцити и циментобласти.

Човешкият PDL съдържа група стволови клетки, PDLSCs, експресиращи повърхностни маркери на MSCs, със способност за самообновяване и мултипотентен капацитет (132). Тези клетки играят решаваща роля в регенерирането и поддържането на хомеостазата на пародонталната тъкан, прикрепването на зъбите и костите и дъвкателната функция. PDLSC са обстойно изследване и се считат за най-подходящия източник за пародонтална регенерация поради тяхната достъпност и способност да секретират минерализирани структури (133).

Въпреки че остеоиндуктивният потенциал на PDSCs е по-малко изявен в сравнение с DPSCs и SHED, те допринасят за регенерацията на PDL тъкан чрез диференциране в циментобласти и образуване на колагенови влакна, вградени в подобна на цимент тъкан (134). Наличието на TGF-β1 сигнализиране определя дали PDLCs се диференцират в лигаментни прогенитори или циментобласти, като инхибирането на TGF-β1 благоприятства фибробластната диференциация (135). Трансплантацията на PDLSC в модел на плъх с пародонтална лезия доведе до генерирането на типични PDL-подобни структури, включително колагенови снопчета, подобни на влакна на Sharpey, свързани с подобни на цимент структури (136).

2.4.4 Стволови клетки от апикална папила

Клетки, произхождащи от апикалната папила, включително остеобласти, одонтобласти, остеоцити и адипоцити, се идентифицират чрез специфични маркери като STRO-1 (137). Освен това, маркери като OCT-4,

Nanog, Sox2 и Rex1 се експресират както от остеобласти, така и от одонтобласти, като допълнително характеризират тяхната линия (138).

Апикалната папила, разположена на върха на развиващите се постоянни зъби, служи като прекурсорна тъкан за радикуларната пулпа, съдържаща стволови клетки със забележителен пролиферативен потенциал. Стволовите клетки, получени от апикалната папила (SCAP), са лесно достъпни от меките тъкани около незрелите постоянни зъби, особено третия молар. SCAP са привличат значителен интерес поради техния капацитет за ремоделиране на дентина и тяхната роля в развитието и регенерацията на корените (139).

В сравнение със стволовите клетки на зъбната пулпа (DPSCs), SCAPs показват повишена способност да ремоделират дентина и могат ефективно да се диференцират в дентин върху повърхностите на скелета (140). Експерименталната трансплантация на SCAPs заедно със стволовите клетки на пародонтален лигамент (PDLSCs) показва обещаващи резултати при обновяването както на тъканите на корена, така и на периодонталния лигамент (141).

Зъбната папила отдавна е призната като основен източник на одонтобласти по време на развитието на зъбите. Тъй като тези специализирани клетки полагат основата на първичния дентин, някога отделната зъбна папила се обвива в нововъзникващата дентинова структура, като постепенно се трансформира в пулпна тъкан. Въпреки това, напоследък фокусът се измести към апикалната папила, което предполага нейната решаваща роля във формирането на кореновия дентин (142).

Съгласно тази нововъзникваща перспектива, сигнализирането от епителната обвивка на корена на Hertwig (HERS) насочва съседните недиференцирани мезенхимни клетки да се диференцират в одонтобласти,

организирайки образуването на коренов дентин. Независимо от това, точното местоположение на тези недиференцирани клетки остава несигурно, предизвиквайки дебат дали те се намират в пулпата или в апикалната папила (143).

2.4.5 Мезенхимни клетки от гингива

Mitrano at al. първи изолират и характеризират гингивални мезенхимни стволови клетки (GMSC), потвърждавайки тяхното придържане към минималните критерии за мезенхимни стволови клетки (MSC) (144). Тези клетки проявяват решаващата способност за многолинейна диференциация, експресират типични MSC маркери и се придържат към повърхностите по време на растеж. За разлика от други дентални MSC, GMSC предлагат изключителна достъпност, тъй като могат да бъдат събрани без необходимост от изваждане на зъб. Те могат лесно да бъдат получени от здрави или възпалени гингивални тъкани и могат да бъдат получени от изхвърлени зъбни проби (145).

Подобно на други дентални MSCs, GMSCs показват имуномодулиращи способности, по-специално индуциране на противовъзпалителна поляризация на макрофагите и инхибиране на активността на остеокластите, като по този начин смекчават резорбцията на пародонталната кост в миши модели (146).

Въпреки че in vitro проучванията показват остеогенен потенциал на GMSCs, това не е напълно възпроизведено in vivo (147). Въпреки това, последните изследвания показват, че извънклетъчните везикули (EVs), получени от GMSCs, експресират високи нива на остеогенни маркери като RUNX2 и костни морфогенетични протеини (BMPs), насърчавайки образуването на извънклетъчен матрикс и минерализирани възли в новата кост (148).

Проучванията за трансплантация при плъхове показват обещаващи резултати, като GMSCs регенерират нормална тъкан при поставяне в гингивални лезии. Освен това, кондиционираната среда (CM) от GMSCs показва сравнима ефикасност с тази от стволовите клетки на пародонтален лигамент (PDLSCs) при индуциране на регенерация на периодонтален лигамент при модели на плъхове (149).

2.5 Имунофлуоресцентни повърхностни маркери

Имунофлуоресцентните повърхностни маркери за класически метод за идентифициране и характеризиране на клетки. В случея се характеризираха стволови клетки от орален произход чрез специфични стволови и тъканно специфични маркери.

CD271, известен също като рецептор на неврален растежен фактор (NGFR) или p75 невротрофен рецептор, обхваща разнообразен набор от физиологични процеси, включително развитие на неврони, модулация на имунния отговор и прогресия на рака. Последните изследвания подчертават значението на CD271 в поддържането и диференциацията на стволови клетки, което показва потенциални приложения в регенеративната медицина. Неговата роля в имунната хомеостаза, особено чрез експресията му върху регулаторните Т клетки, е привлякла внимание в проучвания за имуномодулация (150). Свръхекспресията на CD271 при различни видове рак, като рак на гърдата и меланом, подчертава връзката му с агресивно поведение на тумора и лоша прогноза, което подтиква изследване на насочени към CD271 терапевтични стратегии (151) . Като член на суперсемейството рецептори на тумор некротизиращ фактор, CD271 участва в различни клетъчни процеси, включително апоптоза, клетъчна диференциация и имунна регулация. Неговата експресия е особено видна в нервната система, където модулира отзивчивостта на невроните към невротрофини NGFR. Освен неговите невротрофични

функции, CD271 е замесен в различни патологични състояния, включително невродегенеративни заболявания и рак. Спрямо литературни данни CD271 участва в регулацията на здравето и болестта, улеснявайки разработването на целеви терапии с потенциал за подобряване на резултатите за пациентите. Бъдещите изследователски насоки могат да се съсредоточат върху изясняването на точните механизми на действие на CD271 в различни типове клетки в контекста на заболяванията, както и върху изследване на неговата полезност като диагностичен маркер и терапевтична цел в клинични условия (152).

CD49f, известен също като интегрин α6, е протеин на клетъчната повърхност, който играе решаваща роля в биологията на MSC. MSC са мултипотентни клетки, способни да се диференцират в различни типове клетки, включително остеобласти, адипоцити и хондроцити. CD49f е един от ключовите маркери, използвани за идентифициране и изолиране на MSC от различни тъканни източници, поради високата си експресия на повърхността на тези клетки (153). Освен ролята си на маркер, CD49f участва в регулирането на поведението на MSC, включително адхезия към компоненти на извънклетъчния матрикс и миграция към местата на тъканно увреждане. Освен това, сигнализирането на CD49f е замесено в поддържането на стволовостта на MSC и модулирането на техния потенциал за диференциация (154).

STRO-1 е антитяло, използвано за изолиране и идентифициране на MSC от различни тъканни източници. Той специфично разпознава антиген, експресиран на повърхността на MSC (155). Този антиген, въпреки че точната му идентичност остава неуловима, е широко използван като маркер за MSCs поради неговата последователна експресия в различни видове тъкани. STRO-1-позитивните MSC притежават мултипотентни способности за диференциация, което им позволява да се диференцират в

различни типове клетки като остеобласти, адипоцити и хондроцити (156). Освен това STRO-1 е допринесъл за напредъка в изследванията на базирани на MSC терапии за регенерация и възстановяване на тъкани в различни медицински приложения (157).

Колаген тип I α 2 (COL1A2) е решаващ компонент на извънклетъчния матрикс (ECM), осигуряващ структурна подкрепа и цялост на различни тъкани в тялото. Това е основният подтип на колаген, открит в съединителните тъкани като кости, кожа, сухожилия и връзки (158). Като основна съставна част на ECM, COL1A2 играе основна роля в поддържането на здравината на тъканите, еластичността и цялостната архитектура (159). Мутациите в гена COL1A2 могат да доведат до различни заболявания на съединителната тъкан, включително имперфектна остеогенеза, състояние, характеризиращо се с чупливи кости и други скелетни аномалии. Освен това, дисрегулацията на експресията на COL1A2 е замесена във фиброзни заболявания като белодробна фиброза и цироза на черния дроб (160).

Колаген тип III α 1 (COL3A1) е протеин, кодиран от гена COL3A1, и е основен компонент на извънклетъчната матрица (ECM) в различни тъкани, особено в кожата, кръвоносните съдове и вътрешните органи. Той образува фибриларна мрежа заедно с колаген тип I, осигурявайки структурна подкрепа и еластичност на тъканите. COL3A1 е от решаващо значение за поддържане целостта и здравината на тъканите, особено в структури, подложени на механичен стрес, като кръвоносни съдове и кожа (161). Мутациите в гена COL3A1 могат да доведат до васкуларен синдром на Ehlers-Danlos, рядко генетично заболяване, характеризиращо се с крехки кръвоносни съдове и тънка кожа, която лесно се наранява (162). В допълнение, дисрегулацията на експресията на COL3A1 е замесена в състояния като фиброза и някои видове рак (163).

Виментин е протеин от междинен филамент от тип III, който е широко експресиран в мезенхимни клетки, включително фибробласти, ендотелни клетки и клетки на имунната система. Той играе ключова роля в поддържането на клетъчната структура и целостта, като осигурява механична опора на клетката (164). Виментин участва в различни клетъчни процеси, включително клетъчна миграция, адхезия и сигнализиране (165). Освен това, виментин е замесен в прехода от епител към мезенхим (EMT), процес, при който епителните клетки придобиват мезенхимни характеристики, често свързани с ракови метастази и ремоделиране на тъкани по време на заздравяване на рани. Неговата експресия може да служи като маркер за мезенхимни клетки и се използва в имунохистохимията за идентифициране на тумори с мезенхимен произход (166).

Nestin е междинен филаментен протеин, който се експресира предимно в неврални стволови клетки (NSCs) по време на ембрионалното развитие и в различни региони на мозъка на възрастни, където се случва неврогенезата. Той служи като маркер за невралните прогениторни клетки и участва в поддържането на техния пролиферативен капацитет и способност за самообновяване (167). Експресията на Nestin се регулира надолу, тъй като невралните прогениторни клетки се диференцират в неврони, астроцити или олигодендроцити. Въпреки това, при определени патологични състояния като мозъчно увреждане или невродегенеративни заболявания, експресията на нестин може да се активира отново в зрели астроцити или реактивни глиални клетки като част от регенеративния отговор (168).

CD44H, известен също като CD44 стандартна изоформа, е гликопротеин на клетъчната повърхност, кодиран от гена CD44. Той принадлежи към фамилията CD44 молекули за клетъчна адхезия и участва

в различни клетъчни процеси, включително взаимодействия клетка-клетка, клетъчна адхезия, миграция и сигнализиране (169). CD44H се експресира в широк диапазон от типове клетки, включително хематопоетични клетки, ендотелни клетки и епителни клетки. Той играе важна роля в регулирането на имунния отговор, насочването на лимфоцитите и активирането на лимфоцитите. CD44H също е замесен в прогресията на рака, метастазите и резистентността към химиотерапия, което го прави потенциална цел за терапия на рак (170). В допълнение, CD44H се свързва с възпаление, заздравяване на рани и процеси на регенерация на тъкани (171).

Цитокератин 19 (CK19) е член на семейството цитокератин от протеини, които са междинни нишки, намиращи се в цитоплазмата на епителните клетки. CK19 е особено разпространен в тъкани, получени от ендодерма, като черен дроб, панкреас и стомашно-чревен тракт, както и в някои видове жлезисти епители и стратифицирани епители. Той служи като маркер за епителни клетки и обикновено се използва в имунохистохимията за идентифициране на различни видове епителни тумори, включително карциноми. Освен това експресията на CK19 е изследвана в стволови клетки, ракови стволови клетки и като прогностичен маркер за определени злокачествени заболявания (172-174).

CD146, известен също като адхезионна молекула на меланомна клетка (MCAM) или свързан с меланома антиген A32, е трансмембранен гликопротеин, принадлежащ към суперсемейството на имуноглобулините (175). Той се експресира предимно върху ендотелни клетки, особено тези, свързани с кръвоносните съдове, както и върху подгрупи от перицити, гладкомускулни клетки и някои имунни клетки. CD146 играе значителна роля в различни физиологични и патологични процеси, включително ангиогенеза, съдово развитие, модулация на имунния отговор и прогресия на тумора. Неговото участие в ангиогенезата предполага роля в съдовото

ремоделиране и миграцията на ендотелните клетки (176). CD146 също е замесен в насърчаването на миграцията на туморни клетки, инвазията и метастазите при различни видове рак, включително меланом, рак на гърдата и рак на простатата. Освен това, експресията на CD146 е свързана с тежестта на заболяването и лошата прогноза при някои злокачествени заболявания (177).

CD71, известен също като трансферинов рецепторен протеин 1 (TFRC), е рецепторен протеин на клетъчната повърхност, който играе решаваща роля в клетъчното усвояване на желязо. Той участва в интернализацията на свързаното с трансферин желязо в клетките чрез рецептор-медиирана ендоцитоза (178). CD71 е силно експресиран на повърхността на бързо пролиферииращи клетки, като активирани лимфоцити и еритроидни прогениторни клетки, където улеснява усвояването на желязо, необходимо за клетъчния растеж и пролиферация (179). Като такива, нивата на експресия на CD71 често са повишени при състояния, характеризиращи се с повишена клетъчна пролиферация, като рак и възпаление. Освен това, CD71 се очертава като потенциална терапевтична цел за лечение на рак поради свръхекспресията си върху раковите клетки и ролята му в подпомагането на техния растеж и оцеляване чрез повишено усвояване на желязо (180).

CD117, известен също като c-kit или рецептор на фактор на стволови клетки (SCFR), е рецепторна тирозин киназа на клетъчната повърхност, кодирана от KIT гена (181). Той играе решаваща роля в различни клетъчни процеси, включително клетъчно оцеляване, пролиферация, диференциация и миграция (182). CD117 е широко експресиран в хемопоетичните стволови клетки, мастоцитите, меланоцитите и зародишните клетки, където регулира тяхното развитие и функция. В допълнение към своите физиологични роли, CD117 е замесен в няколко патологични състояния,

включително ракови заболявания като стомашно-чревни стромални тумори (GIST), остра миелоидна левкемия (AML) и някои видове тумори на зародишни клетки. CD117 също се използва като диагностичен маркер за идентифициране на клетки от хематопоетичен произход и някои видове рак (183).

DSPP, или дентинов сиалофосфопротеин, е протеин, експресиран основно в одонтобластите, клетките, отговорни за образуването на дентина, и играе решаваща роля в развитието и минерализацията на зъбите. Той се секретира от одонтобластите в матрицата на дентина, където участва в регулацията на минерализацията на дентина и допринася за механичните свойства на зъбите (184). DSPP се подлага на протеолитична обработка за генериране на дентинов сиалопротеин (DSP) и дентинов фосфопротеин (DPP), като и двата са от съществено значение за правилното формиране на дентин (185). Мутациите в DSPP гена са свързани с различни зъбни заболявания, включително dentinogenesis imperfecta, състояние, характеризиращо се с анормално образуване на дентин и чупливост на зъбите (186).

Oct-3/4, известен също като POU5F1, е транскрипционен фактор, принадлежащ към семейството на домейни POU (Pit-Oct-Unc). Той играе решаваща роля в поддържането на плурипотентността и самообновяването в ембрионалните стволови клетки (ESCs) и индуцираните плурипотентни стволови клетки (iPSCs) (187). Oct-3/4 е един от ключовите транскрипционни фактори, участващи в препрограмирането на соматичните клетки в плурипотентни стволови клетки. Той регулира експресията на гени, които са от съществено значение за плурипотентността, включително други транскрипционни фактори като Nanog и Sox2 (188). Експресията на Oct-3/4 е строго регулирана по време на ембрионалното развитие, с високи нива във вътрешната клетъчна маса

на ембриона в стадий на бластоциста (189). В допълнение към ролята си в ембрионалното развитие и плурипотентността на стволовите клетки, Oct-3/4 е замесен в различни процеси, включително прогресия на рака и определяне на клетъчната съдба (190).

SOX9, член на групата на транскрипционните фактори с висока мобилност (HMG), свързана със SRY, играе критична роля в ембрионалното развитие и клетъчната диференциация, особено при образуването на хрущяли и мъжките полови жлези. Той участва в регулирането на експресията на гени, които са от съществено значение за хондрогенезата, процесът чрез който се образува хрущялът и е от решаващо значение за развитието на различни скелетни елементи, включително гръбначния стълб и крайниците (191). Освен това, SOX9 е необходим за диференциацията на клетките на Сертоли в развиващите се тестиси, където регулира експресията на гени, участващи в сексуалното развитие и плодовитостта на мъжете (192). Мутациите в гена SOX9 могат да доведат до скелетни аномалии, като кампомелична дисплазия и нарушения на половото развитие, което подчертава значението му за човешкото развитие и здраве. Освен това SOX9 е замесен в различни заболявания, включително рак, където може да действа като онкоген или туморен супресор в зависимост от контекста (193).

ALP означава алкална фосфатаза, ензим, открит в различни тъкани в тялото, включително черния дроб, костите, бъбреците и червата. Той играе жизненоважна роля в катализирането на хидролизата на фосфатни естери в алкална среда, което води до освобождаване на неорганичен фосфат (194). Алкалната фосфатаза е особено важна в костния метаболизъм, където улеснява минерализацията чрез разцепване на фосфатни групи от молекули като пирофосфат, като по този начин насърчава отлагането на калциеви и фосфатни йони в костната матрица (195). Повишените нива на

ALP в кръвта могат да показват състояния като чернодробно заболяване, костни нарушения или някои видове рак. Обратно, намалената активност на ALP може да бъде свързана със състояния като хипофосфатазия, рядко генетично заболяване, характеризиращо се с дефектна минерализация на костите. ALP се използва и като маркер в лабораторни тестове за оценка на здравето на черния дроб и костите (196).

BMP4, или костен морфогенетичен протеин 4, е член на суперсемейството протеини на трансформиращия растежен фактор-бета (TGF-β). Той играе решаваща роля в ембрионалното развитие, особено във формирането на различни тъкани и органи, включително кости, сърце и нервна система. BMP4 участва в регулирането на клетъчната пролиферация, диференциация и апоптоза по време на развитие и тъканна хомеостаза (197). Това е ключова сигнална молекула в остеогенезата, където насърчава диференциацията на мезенхимни стволови клетки в остеобласти, клетките, отговорни за образуването на кост (198). Освен това, BMP4 е от съществено значение за развитието на сърцето, тъй като регулира кардиомиоцитната диференциация и морфогенезата на сърдечния изходящ тракт (199). Разбирането на функциите и регулаторните механизми на BMP4 е от решаващо значение за изясняване на неговите роли в развитието, регенерацията на тъканите и патогенезата на заболяването, както и за разработване на терапевтични интервенции, насочени към сигналните пътища на BMP4.

FGF7, известен също като фибробластен растежен фактор 7 или кератиноцитен растежен фактор (KGF), е член на семейството протеини на фибробластния растежен фактор (FGF). Той играе критична роля в пролиферацията на епителните клетки, диференциацията и възстановяването на тъканите, особено в епителните тъкани като кожата, белите дробове и стомашно-чревния тракт (200). FGF7 действа чрез

свързване към своите рецептори, FGFR2b и FGFR3c, които се експресират предимно върху епителните клетки (201). При свързване FGF7 стимулира клетъчната пролиферация, миграция и оцеляване, насърчавайки регенерацията на тъканите и заздравяването на рани. В кожата FGF7 е от съществено значение за поддържане на целостта на епидермиса и насърчаване на развитието на космения фоликул (202). В белите дробове FGF7 играе решаваща роля в белодробната морфогенеза и възстановяване след нараняване, докато в стомашно-чревния тракт той регулира пролиферацията на епителните клетки и целостта на лигавицата. Промяна в регулацията на сигнализирането на FGF7 води до различни заболявания, включително рак, фиброза и възпалителни заболявания (203,204).

2.6 Гени за човешки екстрацелуларни матрикс и адхезионни молекули

Взаимодействията между клетките се осъществяват чрез различни семейства рецептори. Тези рецептори не само медиират клетъчното прилепване към специфични протеини на извънклетъчния матрикс и лиганди на съседни клетки, но също така регулират множество клетъчни процеси като растеж, диференциация, формиране на връзки и полярност. В човешкото тяло се намират многобройни семейства адхезионни молекули, изпълнявайки разнородни функции. В интерес на нашето пручване основно се концентрирахме към групата на интегрините, матрикс металопротеинази, колагени, ламинини.

2.6.1 Интегрини

Интегрините се кодират от различни алфа и бета субединици, които са трансмембранни протеини, участващи в клетъчната адхезия и сигнализиране. Интегрините формират хетеродимери чрез комбиниране на алфа и бета субединици, които регулират взаимодействията между

клетките и извънклетъчния матрикс, като играят ключова роля в процеси като клетъчна миграция, пролиферация и диференциация (205). Различните комплекси интегрини се свързват със специфични лиганди като колаген, ламинин и фибронектин, и участват в редица физиологични и патологични процеси, включително развитие на тъкани, зарастване на рани, възпаление, тромбоза, ангиогенеза, метастази и автоимунни заболявания (206). Някои от тези интегрини са особено важни за имунната система, регулиране на възпалението и кръвосъсирването, докато други играят ключова роля в специфични тъкани като епителни и мускулни клетки. Дисрегулацията на тези интегрини може да доведе до различни заболявания, включително рак, мускулни дистрофии и имунодефицитни разстройства (207).

ITGA1 кодира алфа-1 субединицата на интегрин, която играе ключова роля в клетъчната адхезия и сигнализиране. Алфа-1 субединицата се комбинира с бета-1 субединицата, образуваща интегрин алфа1бета1. Интегрин алфа1бета1 се свързва с колаген тип IV и е важен за клетъчната миграция, пролиферация и оцеляване. Този интегрин е експресиран в ендотелни, епителни и някои имунни клетки. Генът ITGA1 е свързан с физиологични процеси като зарастване на рани и патологии като ракови метастази (208).

ITGA2 кодира алфа-2 субединицата на интегрин, която също участва в клетъчната адхезия и сигнализиране. Алфа-2 се комбинира с бета-1 субединицата, формираща интегрин алфа2бета1. Интегрин алфа2бета1 се свързва с колаген тип I и е важен за клетъчната адхезия и миграция. Този интегрин е експресиран на тромбоцити, фибробласти и имунни клетки. Генът ITGA2 участва в хемостазата, зарастването на рани и е свързан с метастази на рак (209).

ITGA3 кодира алфа-3 субединицата на интегрин, която играе роля в клетъчната адхезия и сигнализиране. Алфа-3 се комбинира с бета-1, образуваща интегрин алфа3бета1. Интегрин алфа3бета1 се свързва с ламинин и е експресиран в епителни, ендотелни и имунни клетки. Той е важен за клетъчната адхезия към базални мембрани и регулира миграцията и диференциацията на клетките. Генът ITGA3 участва в процеси като развитие на тъкани и възпаление, а също така е свързан с ракови метастази (210).

ITGA4 (CD49D) кодира алфа-4 субединицата на интегрин, която е важна за клетъчната адхезия и сигнализиране. Алфа-4 се комбинира с бета-1 субединицата, образуваща интегрин алфа4бета1. Интегрин алфа4бета1 се свързва с VCAM-1 и фибронектин, като участва в миграцията на левкоцити. Той е експресиран в левкоцити, ендотелни и хемопоетични стволови клетки. Генът ITGA4 е свързан с възпаление, хематопоеза и автоимунни заболявания (211).

ITGA5 кодира алфа-5 субединицата на интегрин, която участва в клетъчната адхезия и сигнализиране. Алфа-5 се комбинира с бета-1, образуваща интегрин алфа5бета1 (фибронектинов рецептор). Интегрин алфа5бета1 се свързва предимно с фибронектин и е експресиран в фибробласти, ендотелни и гладкомускулни клетки. Той е важен за клетъчната миграция и пролиферация, а също така участва в ангиогенезата. Генът ITGA5 е свързан с развитие на тъкани, зарастване на рани и ракови метастази (212).

ITGA6 кодира алфа-6 субединицата на интегрин, която участва в клетъчната адхезия и сигнализиране. Алфа-6 се комбинира с бета-1, образуваща интегрин алфа6бета1. Интегрин алфа6бета1 се свързва с ламинин и е експресиран в епителни, ендотелни и имунни клетки. Този интегрин е важен за клетъчната адхезия към базални мембрани и регулира

клетъчната миграция и оцеляване. Генът ITGA6 участва в развитие на тъкани, зарастване на рани и възпаление (213).

ITGA7 кодира алфа-7 субединицата на интегрин, участваща в клетъчната адхезия и сигнализиране. Алфа-7 се комбинира с бета-1, образуваща интегрин алфа7бета1. Интегрин алфа7бета1 се свързва с ламинин и е експресиран в скелетни и гладкомускулни клетки, миобласти и някои имунни клетки. Той е важен за клетъчната адхезия към базални мембрани и регулира клетъчната миграция и диференциация. Генът ITGA7 участва в мускулно развитие и регенерация и е свързан с мускулни дистрофии (214).

ITGA8 кодира алфа-8 субединицата на интегрин, която играе роля в клетъчната адхезия и сигнализиране. Алфа-8 се комбинира с бета-1, образуваща интегрин алфа8бета1. Интегрин алфа8бета1 се свързва с фибронектин и е експресиран в бъбреци, белите дробове и мозъка. Този интегрин е важен за клетъчната адхезия и регулира клетъчната миграция и пролиферация. Генът ITGA8 участва в развитие на тъкани, зарастване на рани и е свързан с заболявания като рак и фиброза (215).

ITGAL кодира алфа-L субединицата на интегрин, известен също като CD11a. Интегрин алфа-L се комбинира с бета-2, за да образува LFA-1, важен за адхезията на левкоцити. LFA-1 е експресиран в различни имунни клетки и медиира адхезията към ендотелните клетки. Интегринът играе ключова роля в процесите на имунен надзор и екстравазация на левкоцити. Генът ITGAL е свързан с имунни отговори и може да участва в автоимунни заболявания (216).

ITGAM кодира алфа-M субединицата на интегрин, известен също като CD11b или Mac-1. Интегрин алфа-M се комбинира с CD18, образуваща Mac-1 интегрин комплекс. Mac-1 е експресиран основно в неутрофили, моноцити и макрофаги. Той е важен за левкоцитната адхезия,

миграция и фагоцитоза. Генът ITGAM е свързан с възпалителни и автоимунни заболявания, като ревматоиден артрит (217).

ITGAV кодира алфа-V субединицата на интегрин, която участва в клетъчната адхезия и сигнализиране. Интегрин алфа-V се комбинира с различни бета субединици, образуващи хетеродимерни комплекси. Тези комплекси медиират адхезията към фибронектин, витронектин и фибриноген. Интегрин алфа-V играе роля в клетъчната миграция, ангиогенеза и туморна метастаза. Генът ITGAV е свързан с различни патологични състояния, включително рак и сърдечно-съдови заболявания (218).

ITGB1 кодира бета-1 субединицата на интегрин, която формира хетеродимерни комплекси с различни алфа субединици. Интегрин алфа-бета1е важен за клетъчната адхезия и взаимодействие с извънклетъчния матрикс. Тези интегрини са експресирани на много видове клетки, включително епителни, фибробласти и имунни клетки. Интегринът участва в клетъчната миграция, пролиферация и оцеляване. Генът ITGB1 е свързан с много физиологични и патологични процеси, включително рак и възпалителни заболявания (219).

ITGB2 кодира бета-2 субединицата на интегрин, известна също като CD18. Бета-2 се комбинира с различни алфа субединици, формиращи интегринови комплекси като LFA-1 и Mac-1. Интегрини, съдържащи бета-2, играят ключова роля в имунния отговор и адхезията на левкоцити. Те са експресирани основно на имунни клетки и медиират клетъчната миграция и фагоцитоза. Генът ITGB2 е свързан с автоимунни заболявания и имунодефицитни състояния (220).

ITGB3 кодира бета-3 субединицата на интегрин, известна също като CD61. Бета-3 се комбинира с алфа-1 или алфа-2, образуваща интегрините αIIbβ3 (GPIIb/IIIa) и αvβ3. Интегрин αIIbβ3 играе важна роля в

тромбоцитната агрегация и хемостазата. Интегрин αvβ3 е свързан с ангиогенеза, клетъчна миграция и метастази. Генът ITGB3 е свързан с тромбоцитни разстройства и е включен в патогенезата на някои ракови заболявания (221).

2.6.2 Матрикс металопротеинази

Матрични металопротеинази (MMP) са ензими, важни за разграждането и ремоделиране на извънклетъчния матрикс (ECM). Имат ключова роля в клетъчната миграция, инвазия и ремоделиране на тъканите (222). Те се експресират в различни клетки и участват в процеси като заздравяване на рани и ангиогенеза. Нарушената регулация на тези MMPs е свързана с патологични състояния като рак и фиброза (223).

Те участват в процеси като клетъчна миграция, инвазия, ангиогенеза и възстановяване на тъканите, като разцепват различни компоненти на ECM, включително колагени, фибронектин и ламинин. Тези протеази са важни за нормалното тъканно ремоделиране, но тяхната дисрегулация може да доведе до патологични състояния като рак, фиброза и съдови заболявания (224).

MMP2 и **MMP3** разграждат колаген тип IV и други ECM протеини, подпомагайки клетъчната миграция и възстановяване на тъканите (225). Те играят важна роля във физиологични процеси, но тяхната абнормална активност може да доведе до заболявания като артрит и сърдечно-съдови нарушения (226).

MMP7, MMP8 и **MMP9** също участват в разграждането на ECM, като регулират клетъчната миграция и възпалителни отговори (227). MMP7, известен като матрилизин, активира други MMPs, а MMP8, който се експресира предимно в неутрофилите, е важен за възпалителните реакции (228).

MMP10 и **MMP11** (Stromelysin-3) играят роля в ремоделирането на тъканите и регулират клетъчната миграция и инвазия, но също така са свързани с патологични състояния като рак и възпалителни заболявания (229).

MMP12, известен още като макрофагова еластаза, е важен за разграждането на еластин и участва в възпалителни процеси, особено при хронични белодробни заболявания (230).

MMP13 (колагеназа 3) разгражда предимно колаген тип II, играейки роля в патогенезата на остеоартрит и други ставни заболявания (231).

TIMP1 е инхибитор на MMPs и регулира баланса между разграждането и синтеза на ECM, което е критично за нормалното тъканно ремоделиране и заздравяване на рани (232).

TIMP2 и **TIMP3** предотвратяват прекомерното разграждане на извънклетъчния матрикс, което е важно за тъканната хомеостаза, заздравяването на рани и ангиогенезата. Освен инхибирането на MMPs, TIMP2 и TIMP3 изпълняват и независими функции, свързани с клетъчна пролиферация, апоптоза и възпаление(232). Дисрегулацията на тези гени е свързана с различни заболявания като рак, сърдечно-съдови заболявания и тъканна фиброза (233).

ADAMTS1 участва в ремоделирането на извънклетъчния матрикс, ангиогенезата и възпалителните процеси. Той регулира структурата и функциите на матричните протеини и взаимодейства с клетъчните рецептори. Нарушената експресия на ADAMTS1 се свързва с различни заболявания, включително рак и сърдечно-съдови болести (234).

ADAMTS8 участва в процесите на ремоделиране на извънклетъчния матрикс и ангиогенезата чрез разцепване на определени протеини. Той играе роля в развитието и възстановяването на тъканите, както и в

образуването на нови кръвоносни съдове. Променени нива в ADAMTS8 се свързват с болести като рак и сърдечно-съдови заболявания (235).

ADAMTS13 играе ключова роля в предотвратяването на прекомерно кръвосъсирване чрез разцепване на фактора на фон Вилебранд (VWF) (236). Недостигът или неправилната функция на този ензим може да причини тромботична тромбоцитопенична пурпура (TTP), която води до образуване на малки кръвни съсиреци . TTP е сериозно състояние, което може да доведе до увреждане на органи и животозастрашаващи усложнения (237).

2.6.3 Колагени

Колагеновите гени кодират различни алфа вериги, които изграждат фибриларните и нефибриларните колагени, основни компоненти на извънклетъчния матрикс (ECM). Тези колагени играят ключова роля в поддържането на структурната цялост и механичната здравина на различни тъкани като хрущял, кожа, сухожилия и роговица (238). Мутации или нарушения в експресията на тези гени водят до редица генетични и патологични състояния, като синдром на Стиклер, синдром на Ehlers-Danlos, миопатии, дистрофии и рак. Ролята на тези колагени се простира отвъд структурата, включвайки процеси като регенерация, възпаление и ангиогенеза, което ги прави критични за поддържането на тъканната хомеостаза и отговор на стресови фактори (239).

COL11A1 кодира една от алфа вергиите на колаген тип XI, който е основен компонент на хрущяла, междупрешленните дискове и стъкловидното тяло на окото. Този колаген участва в формирането на хетеротримерни молекули, които придават стабилност и механична здравина на тъканите. Мутации в COL11A1 могат да доведат до синдром на Стиклер тип 2, синдром на Маршал и загуба на слуха. Тези състояния са

свързани с дефекти в съединителната тъкан, причиняващи скелетни аномалии, отпуснатост на ставите и увреждане на слуха (240).

COL14A1 кодира една от алфа вергиите на колаген тип XIV, който участва в формирането на микрофибрили в извънклетъчния матрикс. Този колаген е основен за структурната интегритет на тъканите като кожа, сухожилия и мускули. Мутации или нарушена регулация на COL14A1 могат да предизвикат миопатия и мускулна дистрофия. Промените в COL14A1 също могат да бъдат свързани с фиброза и рак, тъй като те нарушават нормалното ремоделиране на ECM и могат да предизвикат тъканна скованост (241).

COL6A2 кодира една от алфа вергиите на колаген тип VI, който формира микрофибрили и е важен за структурата на съединителните тъкани, включително мускули, кожа и хрущяли. Мутации в COL6A2 водят до миопатии като миопатия на Bethlem и вродена мускулна дистрофия на Ullrich. Тези състояния се характеризират с мускулна слабост и ставни контрактури. Колаген VI също е замесен в възстановяването на тъканите и прогресията на рак (242).

COL12A1 кодира колаген тип XII, който играе роля в свързването и стабилизирането на фибриларните колагени в тъкани, подложени на механичен стрес, като кожа и сухожилия. Мутации в COL12A1 могат да бъдат свързани със синдром на Ehlers-Danlos, проявяващ се с хипермобилност на ставите и крехкост на тъканите. Нарушенията в COL12A1 влияят на структурата и механичните свойства на тъканите (243).

COL15A1 кодира колаген тип XV, който играе роля в поддържането на тъканната структура и стабилност чрез взаимодействие с фибриларни колагени и други ECM протеини. Промени в COL15A1 са наблюдавани

при мускулно-скелетни нарушения и синдром на Ehlers-Danlos, като нарушават тъканната хомеостаза и механичната стабилност (244).

COL16A1 кодира колаген тип XVI, участващ в организирането на колагеновата мрежа в тъкани като кожа и хрущял. Той допринася за целостта и еластичността на ECM. Мутации в COL16A1 могат да водят до синдром на Ehlers-Danlos, подобно на COL12A1 и COL15A1, като нарушават структурата и функцията на съединителната тъкан (245).

COL5A1 кодира една от алфа вергиите на колаген тип V, който регулира диаметъра и стабилността на колагеновите фибрили в тъкани, подложени на механичен стрес. Мутации в COL5A1 са свързани със синдром на Ehlers-Danlos, при който дефектите в колаген V водят до нарушения в тъканната структура и механичните свойства (246).

COL6A1 кодира една от алфа вергиите на колаген тип VI, съставляваща микрофибрили, които осигуряват структурна опора и еластичност на съединителните тъкани. Мутации в COL6A1 са свързани с миопатии като миопатия на Bethlem и вродена мускулна дистрофия на Ullrich, характеризиращи се с мускулна слабост и ставни аномалии (247).

COL7A1 кодира алфа веригата на колаген тип VII, който е основен за формирането на закотвящите фибрили в базалната мембрана на кожата и епителните тъкани. Мутации в COL7A1 водят до дистрофична булозна епидермолиза (DEB), състояние, характеризирано с мехури и ерозии по кожата, резултат от дефектно закрепване на епидермиса към дермата (248).

COL8A1 кодира една от алфа вергиите на колаген тип VIII, който играе роля в поддържането на структурата на роговицата, ендотелните и епителните базални мембрани. Мутации в COL8A1 са свързани с ендотелна корнеална дистрофия на Fuchs (FECD), при която има загуба на

роговични ендотелни клетки и удебеляване на десцеметовата мембрана (249).

COL4A2 кодира алфа вергата на колаген тип IV, който формира мрежести структури в базалните мембрани, осигуряващи опора и бариерна функция на различни тъкани и органи. Мутации в COL4A2 водят до синдром на Alport, характеризиращ се с бъбречна недостатъчност, загуба на слуха и очни аномалии, поради дефекти в структурата на базалните мембрани (250).

COL1A1 кодира алфа веригата на колаген тип I, който е основен структурен протеин в съединителната тъкан, осигуряващ здравина на кожа, кости и сухожилия. Мутациите в този ген водят до нарушаване на нормалната структура на колаген тип I, което причинява заболяването остеогенеза имперфектна (OI), характеризираща се с чупливост на костите и деформации. Това заболяване отразява критичната роля на COL1A1 в образуването и минерализацията на костите (251).

2.7.4. Ламинини

Ламинините са големи хетеротримерни гликопротеини, които играят основна роля в структурата и функцията на извънклетъчния матрикс. Те са съставени от три различни вериги: алфа, бета и гама, които образуват кръстовидна структура. Ламинините са ключови за клетъчната адхезия, миграция и сигнализиране, като взаимодействат с рецептори на клетъчната повърхност и други компоненти на матрикса, като колаген и фибронектин (252). Те се намират основно в базалните мембрани, където осигуряват структурна подкрепа на тъканите и регулират техните функции. Промените в ламининовата структура или експресия могат да доведат до различни генетични заболявания и патологии, включително кожни и мускулни заболявания (253).

LAMA1 кодира алфа веригата на ламинин, ключов компонент на извънклетъчния матрикс, отговорен за структурната цялост на базалните мембрани. Ламинин-1, съставен от алфа 1, бета 1 и гама 1 вериги, играе основна роля в клетъчната адхезия и сигнализиране. Намира се в базалните мембрани, където осигурява структурна подкрепа на тъканите и влияе на клетъчната миграция и диференциация. Нарушенията в експресията или структурата на ламинин-1 са свързани с синдрома на Pierson, който се характеризира с бъбречни и очни аномалии. Променените нива на ламинин-1 също са наблюдавани при патологични състояния като рак и фиброза (254).

LAMA2 кодира алфа веригата на ламинин, който е важен за формирането и поддържането на мускулни и нервни тъкани. Ламинин-2, съставен от алфа 2, бета 1 и гама 1 вериги, е особено изобилен в базалните мембрани на скелетните мускули и периферните нерви. Той играе ключова роля в клетъчната адхезия и сигнализиране в тези тъкани. Мутации в LAMA2 водят до вродена мускулна дистрофия с дефицит на ламинин-α2, характеризираща се с мускулна слабост и прогресивна дегенерация. Дефектите в ламинин-2 нарушават нормалното развитие и поддръжка на мускулите и нервната система (255).

LAMA3 кодира алфа веригата на ламинин, която е основен компонент на базалните мембрани в епителните тъкани. Ламинин-3, известен и като ламинин-332, се намира в кожата и лигавиците, където играе ключова роля в поддържането на тъканната целостност и бариерната функция. Той участва в клетъчната адхезия и заздравяването на рани. Мутациите в LAMA3 са свързани с Herlitz junctional epidermolysis bullosa (H-JEB), рядко генетично заболяване, което води до крехкост на кожата и образуване на мехури. Дефектите в ламинин-3 нарушават интегритета на епителните тъкани и тяхната функция (256).

LAMB1 кодира бета веригата на ламинин, който е важен компонент на базалните мембрани и играе роля в клетъчната адхезия и миграция. Той е съставен от алфа 1, бета 1 и гама 1 вериги, е разпространен в различни тъкани и поддържа структурната целостност на базалните мембрани. Мутации в LAMB1 са свързани със синдрома на Pierson, рядко вродено заболяване, което води до бъбречни аномалии, очни дефекти и неврологични увреждания. Нарушенията в него водят до повреда на базалната мембрана и дисфункция на тъканите. Тези дефекти нарушават нормалната функция на органите и тъканите, което води до сериозни здравословни проблеми (257).

LAMB3 кодира бета веригата на ламинин, ключов компонент за поддържането на епителните тъкани и базалните мембрани. Ламинин-332, съставен от алфа 3, бета 3 и гама 2 вериги, е важен за целостта и функциите на кожата и лигавиците. Мутации в LAMB3 водят до Herlitz junctional epidermolysis bullosa (H-JEB), генетично заболяване, което причинява образуване на мехури и крехкост на кожата. Проблемите с експресията или структурата на ламинин-332 нарушават целостта на епителните тъкани и тяхната способност да се възстановяват. Тези дефекти водят до значителни кожни и лигавични проблеми (258).

LAMC1 кодира гама веригата на ламинин, основен компонент на извънклетъчния матрикс, който е от съществено значение за поддържането на базалните мембрани. Ламинин-111, съставен от алфа 1, бета 1 и гама 1 вериги, играе ключова роля в клетъчната адхезия и структура на тъканите. Мутации в LAMC1 са свързани с булозна епидермолиза (JEB), група наследствени кожни заболявания, които водят до образуване на мехури и чупливост на кожата. Нарушенията в функцията на ламинин-111 водят до дефекти в базалната мембрана и сериозни тъканни проблеми. Тези

мутации причиняват значителни проблеми с целостта и функцията на кожата (259).

2.7.4 Гликопротеини

Гликопротеините са молекули, съставени от протеини и въглехидратни вериги, които играят важна роля в клетъчната комуникация, имунния отговор и структурната подкрепа на тъканите.

CD44 е гликопротеин на клетъчната повърхност, участващ в адхезията клетка-клетка и клетка-матрикс, клетъчната миграция, сигнализирането и клетъчното оцеляване. Той функционира като рецептор за хиалуронова киселина (HA), основен компонент на извънклетъчния матрикс, и взаимодейства с различни лиганди, включително остеопонтин, колаген и матрични металопротеинази (MMP). CD44 съществува в множество изоформи поради алтернативен сплайсинг, което води до вариации в неговия извънклетъчен домен и афинитети на свързване за различни лиганди (260).

CD44 се експресира в широк диапазон от типове клетки, включително левкоцити, стволови клетки и епителни клетки, и играе различни роли във физиологични и патологични процеси. Той участва в трафика на имунни клетки, активирането на лимфоцитите и възпалението, както и в развитието на тъканите, заздравяването на рани и прогресията на рака. При рак CD44 често се свързва с ракови стволови клетки, туморна инвазия, метастази и резистентност към химиотерапия (261).

Взаимодействията между CD44 и неговите лиганди регулират различни клетъчни функции, включително клетъчна адхезия, миграция, пролиферация и оцеляване, чрез сигнални пътища надолу по веригата, като тези, включващи Rho GTPases, MAPK и PI3K/Akt. Универсалността на CD44 в медиирането на взаимодействията клетка-матрикс и

сигнализирането го прави критична молекула както в нормалната физиология, така и в патогенезата на заболяването (262).

ICAM1, или междуклетъчна адхезионна молекула 1, е гликопротеин на клетъчната повърхност, който играе решаваща роля в медиирането на клетъчно-клетъчната адхезия и имунните отговори. Той е кодиран от гена ICAM1 и принадлежи към суперсемейството на имуноглобулиновите протеини (263).

ICAM1 се експресира на повърхността на различни видове клетки, включително ендотелни клетки, левкоцити и епителни клетки, и се регулира нагоре в отговор на възпалителни стимули като цитокини (напр. TNF-алфа и IL-1β) и микробни патогени. ICAM1 взаимодейства с левкоцитни интегрини, по-специално свързан с функцията на лимфоцитите антиген 1 (LFA-1, известен също като CD11a/CD18), върху циркулиращите левкоцити, улеснявайки тяхната адхезия към ендотелните клетки и последващата трансендотелна миграция във възпалени тъкани (264).

Чрез ролята си в трафика на левкоцити и набирането на имунни клетки, ICAM1 играе критична роля в регулирането на имунните отговори, възпалението и защитата на гостоприемника срещу патогени. Дисрегулацията на експресията или функцията на ICAM1 е замесена в различни възпалителни заболявания, включително автоимунни разстройства, атеросклероза и хронични възпалителни състояния. ICAM1 също участва в прогресията на тумора и метастазите, където улеснява адхезията, миграцията и инвазията на раковите клетки (265).

NCAM1 или адхезионна молекула на невралните клетки 1 е гликопротеин на клетъчната повърхност, принадлежащ към суперсемейството на имуноглобулините. Той играе решаваща роля в клетъчно-клетъчната адхезия, невралния растеж, синаптичната пластичност и миграцията на невроните по време на развитието. NCAM1 е

кодиран от гена NCAM1 и съществува в няколко изоформи, генерирани чрез алтернативен сплайсинг (266). NCAM1 също така взаимодейства с различни вътреклетъчни сигнални молекули, включително кинази и цитоскелетни протеини, модулирайки низходящите сигнални пътища, участващи в клетъчната адхезия, миграцията и невронния растеж (267).

NCAM1 е замесен в синаптичната пластичност и процесите на учене и памет в мозъка на възрастните. Също така участва в неврорегенерацията и възстановяването след нараняване или невродегенеративни заболявания. Дисрегулацията на експресията или функцията на NCAM1 е свързана с неврологични разстройства, включително шизофрения, разстройства от аутистичния спектър и болестта на Алцхаймер (268).

VCAM1 или васкуларна клетъчна адхезионна молекула 1 е гликопротеин на клетъчната повърхност, който играе критична роля в медиирането на левкоцитната адхезия и трансендотелната миграция по време на възпаление. Той се експресира предимно на повърхността на ендотелните клетки, особено в отговор на възпалителни стимули като цитокини (напр. TNF-алфа и IL-1β) (269).

VCAM1 взаимодейства с интегринови рецептори, особено α4β1 и α4β7, експресирани на повърхността на левкоцитите, включително лимфоцити и моноцити. Това взаимодействие улеснява адхезията и набирането на левкоцити от кръвния поток към местата на възпаление или тъканно увреждане (270).

В допълнение към ролята си в трафика на левкоцитите, VCAM1 участва в други биологични процеси, включително ангиогенеза, атеросклероза и туморна прогресия. Дисрегулацията на експресията или функцията на VCAM1 е замесена в различни възпалителни заболявания, включително ревматоиден артрит, множествена склероза и възпалително заболяване на червата (271).

2.7.5 Селектини

Селектините са семейство клетъчни адхезионни молекули, които участват в медиирането на взаимодействията между кръвните клетки и ендотелните клетки, играейки ключова роля във възпалителния отговор и имунната функция.

SELE, известен също като E-селектин, е клетъчна адхезионна молекула, важна за прикрепването на левкоцити към ендотелни клетки при възпаление (272). Тя се експресира на повърхността на активирани ендотелни клетки в отговор на възпалителни стимули като цитокини (напр. TNF-алфа и IL-1β) и улеснява свързването на левкоцитите, което е важно за възпалителните процеси (272, 273).

SELE участва в сигнали, регулиращи активирането на ендотелните клетки, възпалението и ангиогенезата, чрез взаимодействие с вътреклетъчни сигнални молекули (274). Дисрегулацията на SELE е свързана с възпалителни заболявания като атеросклероза и ревматоиден артрит, както и с туморна ангиогенеза и метастази (275).

SELL, или L-селектин, е адхезионна молекула на левкоцитите, която подпомага свързването и търкалянето им върху ендотелните клетки по време на възпаление (276). Тя взаимодейства с въглехидратни лиганди като сиалил Lewis X (sLeX), улеснявайки преходната адхезия (277). SELL също участва в сигнални пътища, регулиращи активирането и насочването на левкоцитите към лимфоидните органи (278). Дисрегулацията на SELL е свързана с възпалителни заболявания и туморна прогресия (279).

SELP, или P-селектин, е адхезионна молекула на активирани тромбоцити и ендотелни клетки, която медиира адхезията и набирането на левкоцити към възпалени или увредени тъкани (280).

Тя се съхранява в α-гранули на тромбоцитите и телата на Weibel-Palade в ендотелните клетки. При активиране, SELP се премества на

повърхността на клетките и улеснява взаимодействието с левкоцитите (280).

SELP взаимодейства с PSGL-1 на левкоцитите, което е важно за тяхното свързване и търкаляне по съдовия ендотел. Дисрегулацията на SELP е свързана с възпалителни заболявания и тромбоза (281).

2.7.6 Катенини

Катенините са група от свързващи протеини, които играят ключова роля в клетъчната адхезия и комуникация, като свързват кадхерините с актиновия цитоскелет, и са важни за поддържането на тъканната структура и сигнализация.

CDH1, известен като **E-кадхерин**, е клетъчна адхезионна молекула, зависима от калций, която поддържа тъканната цялост и клетъчно-клетъчната адхезия в епителните тъкани (282). Той е част от семейството на кадхерините и се кодиран от гена CDH1.

E-кадхеринът осъществява хомофилна адхезия чрез свързване със съседни молекули на E-кадхерин, образувайки връзки, които стабилизират епителните слоеве. Чрез цитоплазмените си домейни той взаимодейства с катенини (β-катенин, γ-катенин и α-катенин), които свързват E-кадхерин с актиновия цитоскелет и осигуряват структурна стабилност на връзките (284).

E-кадхерин участва в процеси като клетъчна пролиферация, диференциация и миграция, и влияе на клетъчната хомеостаза. Дисрегулацията на E-кадхерин е свързана с патологични състояния, включително ракови метастази и епителен към мезенхимален преход (EMT), при които загубата на E-кадхерин увеличава клетъчната подвижност и инвазивност (283).

CTNND1, известен също като p120-катенин или δ-катенин, е протеин-кодиращ ген, който играе решаваща роля в клетъчно-клетъчната адхезия и сигналната трансдукция. Той е член на семейството на

катениновите протеини, които са важни компоненти на адхеренните връзки и медиираните от кадхерин клетъчно-клетъчни адхезионни комплекси. CTNND1 взаимодейства с цитоплазмения домен на класически кадхерини, като Е-кадхерин, и ги свързва с актиновия цитоскелет, като по този начин стабилизира клетъчно-клетъчната адхезия и поддържа тъканната цялост. В допълнение към ролята си в клетъчната адхезия, CTNND1 също регулира различни сигнални пътища, участващи в клетъчната пролиферация, диференциация и миграция. Чрез взаимодействията си с кадхерини и други сигнални молекули, CTNND1 модулира клетъчни процеси като епителен-мезенхимален преход (EMT), клетъчна полярност и тъканна морфогенеза (284). Дисрегулацията на експресията или функцията на CTNND1 е замесена в различни патологични състояния, включително рак, където може да стимулира прогресията на тумора и метастазите чрез засягане на клетъчно-клетъчната адхезия, инвазия и сигнализиране. Освен това, CTNND1 е замесен в неврологични разстройства като болестта на Алцхаймер, където играе роля в синаптичната пластичност и дендритната стабилност на гръбначния стълб в невроните (285).

CTNNA1, или алфа-катенин, е протеин, който играе ключова роля в клетъчно-клетъчната адхезия. Той е част от комплекса кадхерин-катенин, свързвайки Е-кадхерин с актиновия цитоскелет, което стабилизира клетъчните връзки и регулира адхезията, миграцията и сигнализирането.

Алфа-катенинът също взаимодейства с β-катенин и винкулин, което влияе на динамиката на цитоскелета и клетъчната адхезия. Освен това, той е важен за клетъчната полярност, тъканна морфогенеза и туморогенеза. Дисрегулацията на CTNNA1 е свързана с раковата прогресия и метастази в различни видове рак, като рак на гърдата, колоректален и стомашен рак,

нарушаваща клетъчната адхезия и насърчаваща инвазията на туморните клетки. (286)

CTNNB1, известен също като катенин бета-1 или β-катенин, е протеин-кодиращ ген, който играе критична роля в Wnt сигналния път и клетъчните адхезионни комплекси. β-катенинът е ключов компонент на комплекса кадхерин-катенин, където той взаимодейства с кадхерини, като Е-кадхерин, и ги свързва с актиновия цитоскелет, медиирайки адхезията клетка-клетка и поддържайки целостта на тъканта. В допълнение към ролята си в клетъчните адхезионни комплекси, β-катенинът функционира като транскрипционен ко-активатор в каноничния Wnt сигнален път. В отсъствието на Wnt сигнализиране, β-катенинът се фосфорилира от комплекс за разрушаване, което води до неговото убиквитиниране и протеазомно разграждане. Въпреки това, при активиране на пътя на Wnt, β-катенинът се стабилизира и се премества в ядрото, където взаимодейства с транскрипционните фактори на семейството TCF/LEF, за да регулира експресията на целевите гени, участващи в клетъчната пролиферация, оцеляване и диференциация (287).

CTNND2, известен също като δ-катенин, е ген, кодиращ протеин, който кодира δ-катенин, член на семейството на протеини катенин. δ-катенинът се експресира предимно в мозъка, където играе важна роля в развитието на невроните, синаптичната пластичност и клетъчната адхезия. В мозъка δ-катенинът е локализиран в възбуждащи синапси, където взаимодейства с различни синаптични протеини, включително N-кадхерин, PSD-95 и NMDA рецептори. δ-катенинът участва в регулирането на дендритната морфология на гръбначния стълб, синаптичната сила и клъстерирането на невротрансмитерни рецептори, като по този начин влияе върху синаптичната трансмисия и пластичност (288). Отвъд своите синаптични функции, δ-катенинът е замесен в миграцията на невроните и

невритния растеж по време на развитието на мозъка. Той взаимодейства с цитоскелетни протеини, като актин и микротубули, и модулира цитоскелетната динамика, за да улесни миграцията на невроните и насочването на аксоните. Дисрегулацията на експресията на CTNND2 или мутациите, засягащи функцията на δ-катенин, са свързани с различни неврологични разстройства, включително разстройства от аутистичния спектър и шизофрения. Променени нива на експресия на δ-катенин са наблюдавани в мозъците на индивиди с тези състояния, което предполага потенциални роли в патогенезата на заболяването(289).

2.5.7 Тромбоспондини

Тромбоспондините са семейство от извънклетъчни матрични гликопротеини, които участват в клетъчната адхезия, миграция и ангиогенеза, играейки важна роля в процесите на тъканно ремоделиране и възпаление.

THBS1, известен също като Thrombospondin 1 или TSP-1, е ген, кодиращ протеин, който кодира тромбоспондин-1, многофункционален екстрацелуларен матричен гликопротеин. Тромбоспондин-1 участва в различни биологични процеси, включително клетъчна адхезия, миграция, пролиферация, ангиогенеза и тъканно ремоделиране. Тромбоспондин-1 се секретира от различни типове клетки, включително тромбоцити, ендотелни клетки, фибробласти и имунни клетки, и се намира в извънклетъчния матрикс на много тъкани (290). Той взаимодейства с други извънклетъчни матрични протеини, като фибронектин, колаген и интегрини, както и рецептори на клетъчната повърхност, включително CD36 и интегрини, за модулиране на взаимодействията клетка-матрикс и сигналните пътища. В допълнение към своята структурна роля в извънклетъчния матрикс, тромбоспондин-1 функционира като регулатор на различни клетъчни процеси. Той може да стимулира или инхибира клетъчната адхезия,

миграция и пролиферация, в зависимост от контекста и клетъчната среда (291). Тромбоспондин-1 също има антиангиогенни свойства и може да модулира имунните отговори, възпалението и възстановяването на тъканите. Дисрегулацията на експресията на THBS1 или промените във функцията на тромбоспондин-1 са замесени в различни заболявания, включително рак, сърдечно-съдови заболявания, фиброза и невродегенеративни разстройства. Анормални нива на експресия на тромбоспондин-1 са наблюдавани в тъканите и телесните течности на пациенти с тези състояния, което предполага потенциална роля в патогенезата и прогресията на заболяването (292).

THBS2, известен също като Thrombospondin 2 или TSP-2, е ген, кодиращ протеин, който кодира тромбоспондин-2, член на семейството на тромбоспондин от екстрацелуларни матрични гликопротеини. Тромбоспондин-2 участва в различни биологични процеси, включително взаимодействия клетка-матрикс, тъканно ремоделиране, ангиогенеза и регулиране на клетъчното поведение. Тромбоспондин-2 се секретира от различни видове клетки, включително фибробласти, ендотелни клетки и гладкомускулни клетки, и се намира в извънклетъчния матрикс на много тъкани. Той взаимодейства с други извънклетъчни матрични протеини, като колаген, фибронектин и ламинин, както и рецептори на клетъчната повърхност, включително интегрини и CD36, за модулиране на клетъчната адхезия, миграция и сигнални пътища (293). В допълнение към своята структурна роля в извънклетъчния матрикс, тромбоспондин-2 има регулаторни функции в тъканната хомеостаза и болестните процеси. Той може да модулира ангиогенезата, възпалението и възстановяването на тъканите и е замесен в различни патологични състояния, включително сърдечно-съдови заболявания, фиброза и рак. Нарушаването на регулацията на експресията на THBS2 или промените във функцията на

тромбоспондин-2 са свързани с определени заболявания и състояния. Анормални нива на експресия на тромбоспондин-2 са наблюдавани в тъканите и телесните течности на пациенти с тези състояния, което предполага потенциална роля в патогенезата и прогресията на заболяването (294).

THBS3 или Thrombospondin 3 е протеин-кодиращ ген, който принадлежи към семейството на тромбоспондините на извънклетъчния матричен гликопротеини. THBS3 участва в различни биологични процеси, включително взаимодействия клетка-матрикс, развитие на тъкани и заздравяване на рани. Тромбоспондините са мултидомейн протеини, които играят важна роля в регулирането на клетъчната адхезия, миграцията, пролиферацията и диференциацията. Те взаимодействат с рецептори на клетъчната повърхност, растежни фактори и други извънклетъчни матрични протеини, модулирайки различни сигнални пътища, участващи в тъканната хомеостаза и възстановяване (295). THBS3 се експресира в различни тъкани по време на развитие и във възрастни организми, като особено високи нива се откриват в хрущялите, костите и кожата. В хрущяла THBS3 допринася за регулирането на диференциацията на хондроцитите и организацията на извънклетъчния матрикс, играейки роля в развитието и поддържането на хрущяла (296). Освен това, THBS3 е замесен в процеси на тъканно ремоделиране, като заздравяване на рани и фиброза. Той може да модулира активността на растежните фактори, цитокините и протеазите, участващи в тези процеси, като влияе на баланса между възстановяването на тъканите и образуването на фиброзни белези. Дисрегулацията на експресията или функцията на THBS3 е свързана с различни патологични състояния, включително остеоартрит, фиброза и рак. При остеоартрит промените в нивата на THBS3 могат да допринесат за разграждане на хрущяла и възпаление на ставите. При фиброза THBS3

може да насърчи прекомерно отлагане на извънклетъчния матрикс и втвърдяване на тъканите (297).

2.7.8 Други гени свързани с екстрацелуларни матрикс и адхезионни молекули

HAS1 или хиалуронан синтаза 1 е ензим, който играе ключова роля в биосинтезата на хиалуронан (HA), основен компонент на извънклетъчния матрикс. HA е линеен полизахарид, съставен от повтарящи се дизахаридни единици на глюкуронова киселина и N-ацетилглюкозамин, и участва в различни физиологични и патологични процеси, включително хидратация на тъканите, заздравяване на рани, възпаление и прогресия на рака (298).

HAS1 катализира синтеза на HA чрез добавяне на редуващи се остатъци от глюкуронова киселина и N-ацетилглюкозамин към нарастващата полизахаридна верига в плазмената мембрана. Това е една от трите изоформи на хиалуронан синтаза (HAS1, HAS2 и HAS3), открити при бозайници, всяка с различно разпределение в тъканите и ензимни свойства (299).

Експресията на HAS1 се регулира от различни фактори, включително растежни фактори, цитокини и механични стимули, и се модулира по време на развитие, възстановяване на тъканите и болестни състояния. Дисрегулацията на експресията или активността на HAS1 е замесена в патологични състояния като фиброза, артрит и рак, където анормален синтез на HA допринася за променена тъканна хомеостаза и прогресия на заболяването (300).

PECAM1 (тромбоцитна ендотелна клетъчна адхезионна молекула-1), известен и като CD31, е важен за трафика на левкоцити и съдовата цялост. Той се експресира на ендотелни клетки, тромбоцити и левкоцити, включително моноцити, неутрофили и Т клетки. PECAM1

медиира адхезията между съседни ендотелни клетки и улеснява миграцията на левкоцити през ендотела към възпалителни или увредени тъкани (301). Освен това, участва в сигналните пътища, регулиращи ендотелната функция и съдовата хомеостаза, чрез взаимодействие с протеин тирозин кинази и фосфатази (302).

Дисрегулацията на PECAM1 е свързана с възпалителни заболявания като атеросклероза и ревматоиден артрит, както и с туморна ангиогенеза и метастази, където влияе на разпространението на туморни клетки и съдовата пропускливост (303).

SGCE или епсилон-саркогликан е протеин-кодиращ ген, който кодира епсилон изоформата на саркогликан Е. Саркогликаните са трансмембранни протеини, които са компоненти на комплекса дистрофин-гликопротеин, който играе решаваща роля в поддържането на структурата на мускулните влакна. Протеинът епсилон-саркогликан се експресира предимно в набраздени мускулни тъкани, включително скелетен и сърдечен мускул (304).

Мутациите в гена SGCE са свързани с определени видове дистония, неврологично двигателно разстройство, характеризиращо се с неволни мускулни контракции и необичайни пози. По-конкретно, мутациите в SGCE са свързани с форма на дистония, известна като синдром на миоклонус-дистония (MDS). MDS обикновено се проявява с комбинация от миоклонични резки и дистонични движения, често започващи в детството или юношеството (305).

Точният механизъм, чрез който мутациите в SGCE водят до MDS, не е напълно разбран, но се смята, че нарушава нормалната функция на комплекса дистрофин-гликопротеин, нарушавайки стабилността на мускулната мембрана и синаптичната трансмисия. Тази дисфункция в

крайна сметка води до характерните двигателни аномалии, наблюдавани при индивиди с MDS (306).

SPG7 или параплегин е ген, който кодира протеин, участващ в митохондриалната функция и поддръжка. Мутациите в гена SPG7 са свързани с автозомно-рецесивна наследствена спастична параплегия тип 7 (HSP7), известна също като свързана със SPG7 спастична параплегия (307).

Наследствените спастични параплегии (HSP) са група невродегенеративни заболявания, характеризиращи се с прогресивна слабост и скованост (спастичност) в долните крайници, дължащи се на дегенерация на кортикоспиналните пътища в гръбначния мозък. Свързаната със SPG7 спастична параплегия е резултат от мутации в гена SPG7, което води до дисфункция на протеина параплегин (308).

ANOS1, или Anosmin-1, е ген, кодиращ протеин, свързан с X-свързаната форма на синдрома на Калман, рядко генетично заболяване, характеризиращо се с хипогонадотропен хипогонадизъм и аносмия (неспособността да се възприемат миризми). ANOS1 кодира протеин, наречен anosmin-1, който играе критична роля в развитието на обонятелната система и миграцията на невроните на гонадотропин-освобождаващия хормон (GnRH) по време на ембрионалното развитие. Anosmin-1 участва в насочването на GnRH невроните от техния произход в обонятелната плакода до местоназначението им в хипоталамуса, където те регулират секрецията на гонадотропини, които контролират половото съзряване и възпроизводство (309). Мутациите в гена ANOS1 нарушават нормалната функция на anosmin-1, което води до дефекти в образуването на обонятелни луковици и миграция на GnRH неврони, което в крайна сметка води до характерните черти на синдрома на Kallmann. Индивидите със синдром на Kallmann обикновено имат забавен или липсващ пубертет поради неадекватно производство на полови хормони (хипогонадизъм) и

липса на обоняние (аносмия). Допълнителни симптоми могат да включват безплодие, малки тестиси или яйчници и други аномалии в развитието на репродуктивната система. Лечението на синдрома на Калман често включва хормонална заместителна терапия за предизвикване на пубертета и коригиране на хормоналните дефицити (310). В някои случаи асистираните репродуктивни технологии може да са необходими за лица с безплодие. Ранната диагностика и лечение на синдрома на Калман са важни за оптимизиране на резултатите и справяне със свързаните здравни проблеми (311).

CCN2, известен също като растежен фактор на съединителната тъкан (CTGF), е протеин-кодиращ ген, който принадлежи към CCN семейството на матрицелуларни протеини. CCN2 участва в различни клетъчни процеси, включително клетъчна адхезия, миграция, пролиферация, диференциация и производство на извънклетъчен матрикс (ECM). CCN2 играе решаваща роля в развитието на тъканите, заздравяването на рани и ремоделирането на тъканите чрез модулиране на взаимодействията клетка-ECM и сигналните пътища (314). Той взаимодейства с различни рецептори на клетъчната повърхност, като интегрини и протеогликани, и растежни фактори, включително трансформиращ растежен фактор-бета (TGF-β), за регулиране на клетъчните реакции и синтеза на ECM. В допълнение към своите физиологични роли, дисрегулацията на експресията или функцията на CCN2 е замесена в различни патологични състояния, включително фиброза, рак и сърдечно-съдови заболявания. При фиброза, CCN2 насърчава прекомерното отлагане на ECM компоненти, като колаген и фибронектин, което води до скованост на тъканите и дисфункция на органи. При рак CCN2 може да засили туморния растеж, инвазията и метастазите чрез модулиране на клетъчната миграция, ангиогенезата и туморната микросреда (312).

CLEC3B (тетранектин) е ген, който кодира хомотримерен матричен протеин от семейството на С-тип лектинови домейни. Тетранектин участва в тъканно ремоделиране, ангиогенеза и клетъчна адхезия. Той взаимодейства с плазминоген и тъканен плазминогенен активатор (tPA), като насърчава разграждането на фибрин и други матрични протеини, улеснявайки възстановяването на тъканите. Освен това, тетранектинът модулира ангиогенезата чрез свързване с ангиогенни фактори, като фибробластен растежен фактор 2 (FGF-2), и участва в клетъчната адхезия и миграция чрез взаимодействие с рецептори на клетъчната повърхност и компоненти на матрикса. Дисрегулацията на тетранектин е свързана с рак, сърдечно-съдови и възпалителни заболявания, като променените нива на експресия могат да влияят на туморната прогресия и метастази (313).

CNTN1 (Contactin-1) е ген, кодиращ протеин от семейството на имуноглобулиновите молекули на клетъчната адхезия. Той се експресира предимно в нервната система и играе ключова роля в невронното развитие, насочването на аксоните и синаптичната функция. Contactin-1 участва в клетъчно-клетъчните взаимодействия, като регулира израстването на невритите, насочването на аксоните и образуването на синапси чрез взаимодействие с рецептори на клетъчната повърхност, включително други контактини и NCAMs. Той е важен за формирането и поддържането на синаптичните връзки, влияещи на невронните мрежи и електрическите сигнали в мозъка. Дисрегулацията на Contactin-1 е свързана с неврологични разстройства като аутизъм, епилепсия и шизофрения, с променени нива на експресия наблюдавани в мозъците на засегнатите индивиди (314).

FN1 или фибронектин 1 е протеин-кодиращ ген, който кодира фибронектин, гликопротеин, намиращ се в извънклетъчния матрикс и циркулиращ в плазмата. Фибронектинът участва в различни биологични

процеси, включително клетъчна адхезия, миграция, диференциация, заздравяване на рани и тъканно ремоделиране. Фибронектинът е голям модулен протеин, състоящ се от повтарящи се структурни мотиви, включително фибронектинови домени тип I, тип II и тип III. Той образува фибриларна мрежа в извънклетъчния матрикс и взаимодейства с други протеини на извънклетъчния матрикс, като колаген и протеогликани, както и рецептори на клетъчната повърхност, включително интегрини и синдекани. В допълнение към своята структурна роля, фибронектинът служи като лиганд за клетъчни адхезионни рецептори, медиирайки взаимодействията клетка-матрикс и клетка-клетка. Той играе решаваща роля в ембрионалното развитие, тъканната морфогенеза и хомеостазата, както и при патологични състояния, включително възпаление, фиброза и рак. Дисрегулацията на експресията на FN1 или промените в структурата на фибронектина са свързани с различни заболявания, включително сърдечно-съдови заболявания, фиброзни разстройства и рак. Анормални нива на експресия на фибронектин са наблюдавани в тъканите и телесните течности на пациенти с тези състояния, което предполага потенциална роля в патогенезата и прогресията на заболяването (315).

SPARC, известен също като секретиран протеин кисел и богат на цистеин, е ген, кодиращ протеин, който кодира многофункционален екстрацелуларен матричен гликопротеин. SPARC участва в различни биологични процеси, включително развитие на тъкани, ремоделиране и възстановяване. SPARC се секретира от различни видове клетки, включително фибробласти, ендотелни клетки и имунни клетки, и се намира в извънклетъчния матрикс на много тъкани. Той взаимодейства с други протеини на извънклетъчната матрица, като колаген, фибронектин и протеогликани, както и с рецептори на клетъчната повърхност, включително интегрини и протеин 1, свързан с рецептора на липопротеин

с ниска плътност (LRP1). В допълнение към своята структурна роля в извънклетъчния матрикс, SPARC има регулаторни функции във взаимодействията клетка-матрикс, клетъчно сигнализиране и тъканна хомеостаза. Той може да модулира клетъчната адхезия, миграцията, пролиферацията и диференциацията в зависимост от клетъчния контекст и наличието на други компоненти на извънклетъчната матрица. Дисрегулацията на експресията на SPARC е замесена в различни заболявания и състояния, включително рак, фиброза, сърдечно-съдови заболявания и невродегенеративни разстройства. Анормални нива на SPARC са наблюдавани в тъканите и телесните течности на пациенти с тези състояния, което предполага потенциална роля в патогенезата и прогресията на заболяването (316).

ECM1, известен също като Екстрацелуларен матричен протеин 1, е ген, кодиращ протеин, който кодира извънклетъчен матричен протеин, участващ в различни биологични процеси, включително клетъчна адхезия, миграция и организация на тъканите. ECM1 се експресира предимно в кожата и други съединителни тъкани, където допринася за структурната цялост на извънклетъчния матрикс. ECM1 взаимодейства с различни компоненти на извънклетъчната матрица, като колаген и фибронектин, както и с рецептори на клетъчната повърхност, модулирайки взаимодействията клетка-матрикс и тъканната хомеостаза. Той играе роля в процеси като заздравяване на рани, ангиогенеза и възстановяване на тъканите. В допълнение към своята структурна роля, дисрегулацията на експресията или активността на ECM1 е замесена в различни патологични състояния, включително рак, фиброза и съдови заболявания. Анормалните нива на ECM1 могат да повлияят на клетъчната пролиферация, миграцията и инвазията, допринасяйки за прогресирането на HAS1 (317).

SPP1, известен също като секретиран фосфопротеин 1 или остеопонтин (OPN), е протеин-кодиращ ген, който кодира многофункционален извънклетъчен матричен протеин. SPP1 участва в различни биологични процеси, включително клетъчна адхезия, миграция, пролиферация и тъканно ремоделиране. SPP1/Остеопонтин се експресира предимно в минерализирани тъкани като кости, където играе роля в образуването и ремоделирането на костите. Той взаимодейства с различни рецептори на клетъчната повърхност, включително интегрини и CD44, като модулира взаимодействията клетка-матрикс и сигналните пътища. Освен това, SPP1/Остеопонтин функционира като молекула, подобна на цитокин, регулираща имунните реакции, възпалението и заздравяването на рани. В допълнение към своите физиологични функции, дисрегулацията на експресията или активността на SPP1 е замесена в различни патологични състояния, включително рак, фиброза и сърдечно-съдови заболявания. Анормалните нива на SPP1/остеопонтин могат да повлияят на поведението на клетките, организацията на извънклетъчния матрикс и тъканната хомеостаза, допринасяйки за прогресията на заболяването (318).

Трансформиращият растежен фактор бета 1 (TGF-β1) е цитокин, участващ в различни клетъчни процеси, включително клетъчен растеж, диференциация, апоптоза и имунни отговори. Той е кодиран от гена TGFB1. TGF-β1 играе критична роля в тъканната хомеостаза и заздравяването на рани чрез регулиране на производството и ремоделирането на извънклетъчния матрикс. Може да стимулира синтеза на извънклетъчни матрични протеини като колаген и фибронектин, насърчавайки възстановяването на тъканите и фиброзата. Освен това, TGF-β1 има имуносупресивен ефект, инхибирайки пролиферацията и активността на имунните клетки като Т клетки и макрофаги. В допълнение към своите физиологични функции, дисрегулацията на TGF-β1

сигнализирането е замесена в различни патологични състояния, включително фиброза, рак, автоимунни заболявания и сърдечно-съдови заболявания. Анормалните нива на TGF-β1 могат да допринесат за тъканна фиброза, туморна прогресия и имунна дисфункция (319).

TNC, известен също като Tenascin-C, е ген, кодиращ протеин, който кодира извънклетъчен матричен гликопротеин. TNC участва в различни биологични процеси, включително клетъчна адхезия, миграция, пролиферация и тъканно ремоделиране. TNC се изразява предимно в извънклетъчния матрикс на развиващите се тъкани, местата за заздравяване на рани и областите на тъканно ремоделиране. Той взаимодейства с различни рецептори на клетъчната повърхност, включително интегрини и протеогликани, като модулира взаимодействията клетка-матрикс и сигналните пътища. Освен това TNC играе роля в тъканната морфогенеза, ангиогенезата и имунните отговори. В допълнение към своите физиологични функции, дисрегулацията на експресията или активността на TNC е замесена в различни патологични състояния, включително рак, фиброза и сърдечно-съдови заболявания. Анормалните нива на TNC могат да повлияят на поведението на клетките, организацията на извънклетъчния матрикс и тъканната хомеостаза, допринасяйки за прогресията на заболяването (320).

VCAN, известен също като Versican, е протеин-кодиращ ген, който кодира голям извънклетъчен матричен протеогликан. VCAN е ключов компонент на извънклетъчния матрикс и играе различни роли в различни биологични процеси, включително клетъчна адхезия, миграция, пролиферация и тъканна морфогенеза. Versican взаимодейства с различни рецептори на клетъчната повърхност, като интегрини и хиалуронови рецептори, като модулира взаимодействията клетка-матрикс и сигналните пътища. Той също така се свързва с други протеини на извънклетъчния

матрикс, включително колаген и фибронектин, допринасяйки за организацията на тъканите и хомеостазата. В допълнение към своята структурна роля, дисрегулацията на експресията или активността на VCAN е замесена в различни патологични състояния, включително рак, сърдечно-съдови заболявания и възпалителни заболявания . Анормалните нива на VCAN могат да повлияят на поведението на клетките, състава на извънклетъчния матрикс и функцията на тъканите, допринасяйки за прогресията на заболяването (321).

VTN, известен също като витронектин, е гликопротеин, кодиран от VTN гена. Той играе решаваща роля в различни биологични процеси, включително клетъчна адхезия, миграция, пролиферация и тъканно ремоделиране. Витронектинът се намира в извънклетъчния матрикс и кръвната плазма, където взаимодейства с различни рецептори на клетъчната повърхност, включително интегрини и рецептор на урокиназа плазминогенен активатор (uPAR). Тези взаимодействия медиират клетъчната адхезия към извънклетъчния матрикс и модулират клетъчните реакции като миграция, пролиферация и оцеляване. В допълнение към ролята си в клетъчната адхезия и миграция, витронектинът участва в процеси като заздравяване на рани, тромбоза и регулиране на имунния отговор. Той също така взаимодейства с други извънклетъчни матрични протеини и протеази, допринасяйки за тъканно ремоделиране и хомеостаза (322).

3. 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.

4. Материали и методи

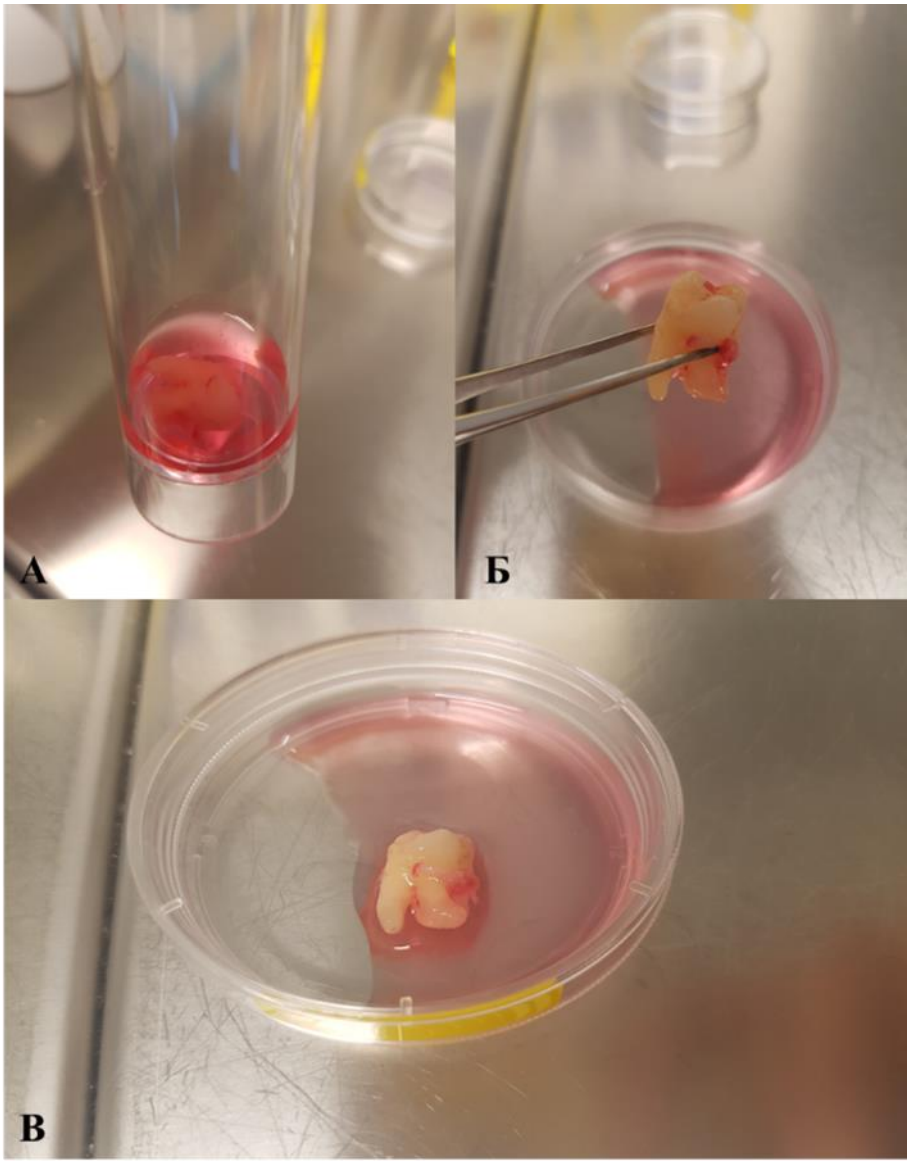
Проучването е одобрено от Комисията по етика на Медицински университет-София. Клетки са изолирани от следните структури: зъбна пулпа от млечни и постоянни зъби, периодонтален лигамент, апикална папила, гингива и алвеоларна кост на хора на възраст под 40 години без системни заболявания и здрав орален 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.

4.1. Изолиране и култивиране на стволови клетки

МСК с орален произход бяха изолирани по утвърдени в литературата методики. Фигура 4.

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 37oC.



Фигура 4. 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

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 37oC.

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 37ºC.

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 37ºC.

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.

4.2 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 5.



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.

4.3 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.

4.1.1 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.

4.1.2 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.

4.1.3 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.

4.1.4 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.

4.1.5 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 дисоциране 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.

4.1.6 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.

4.1.7 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).

4.2 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.

4.2.1 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.

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

4.2.3 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.

4.2.4 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.

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

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

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

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

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

4.3 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.

4.4 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

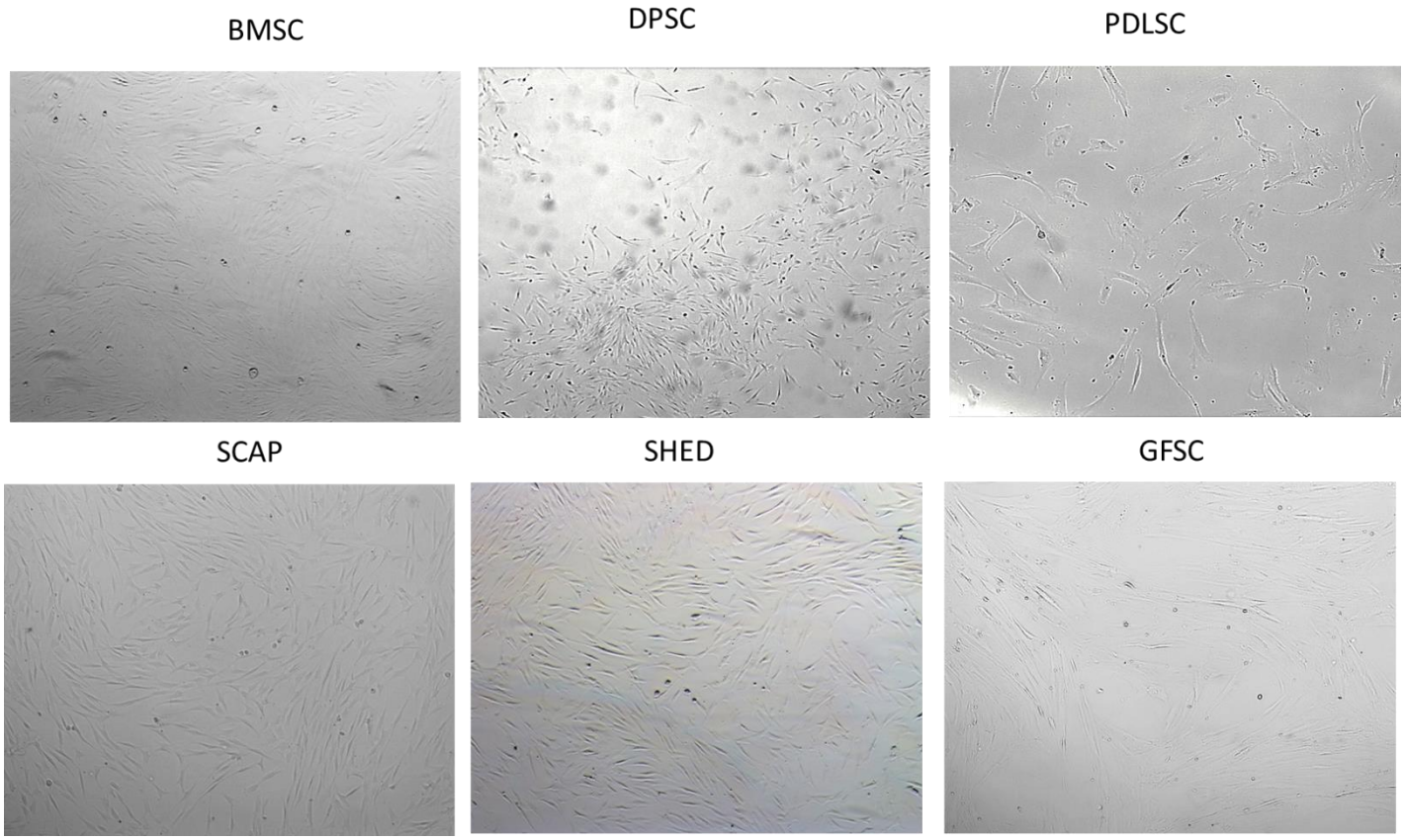
пространство на https://geneglobe.qiagen.com/bg/analyze). Разликата се счита за значителна (P <.05) и по-голяма от 2,0-кратна промяна. Референтни гени за нормализиране на RT-PCR данни бяха GAPDH и b-2 микроглобулин (B2M). За клетъчен анализ с високо съдържание, данните за общ брой около 10 000 клетки 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.).

5. 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 6). 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

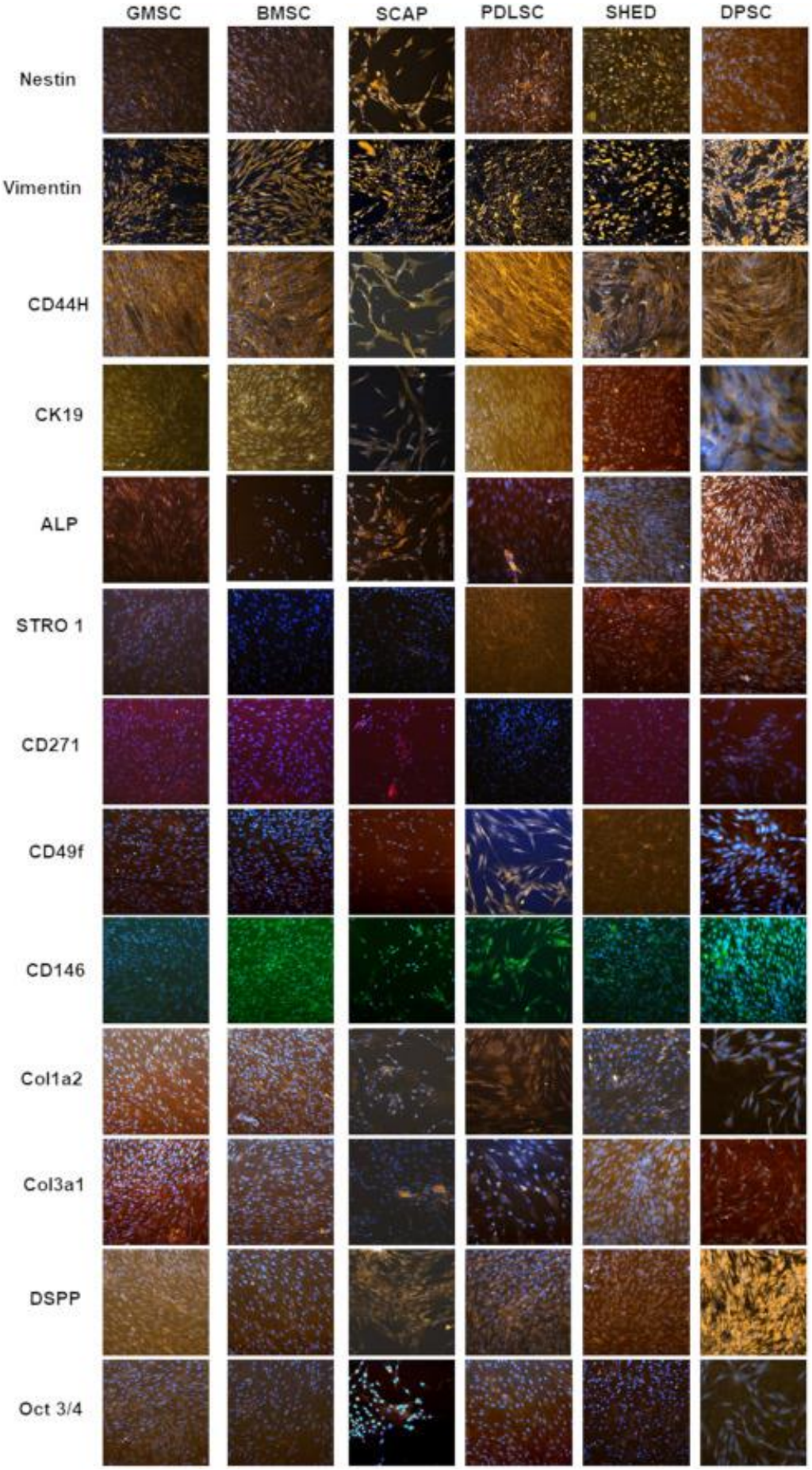
гарантира, че те остават в състояние, подходящо за бъдещи изследвания и приложения.



Фигура 6. Изолирани стволови клетки, заснети на светлинен микроскопо. Увеличение x20.

5.1 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.



Фигура 7. 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.

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 7, 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.

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

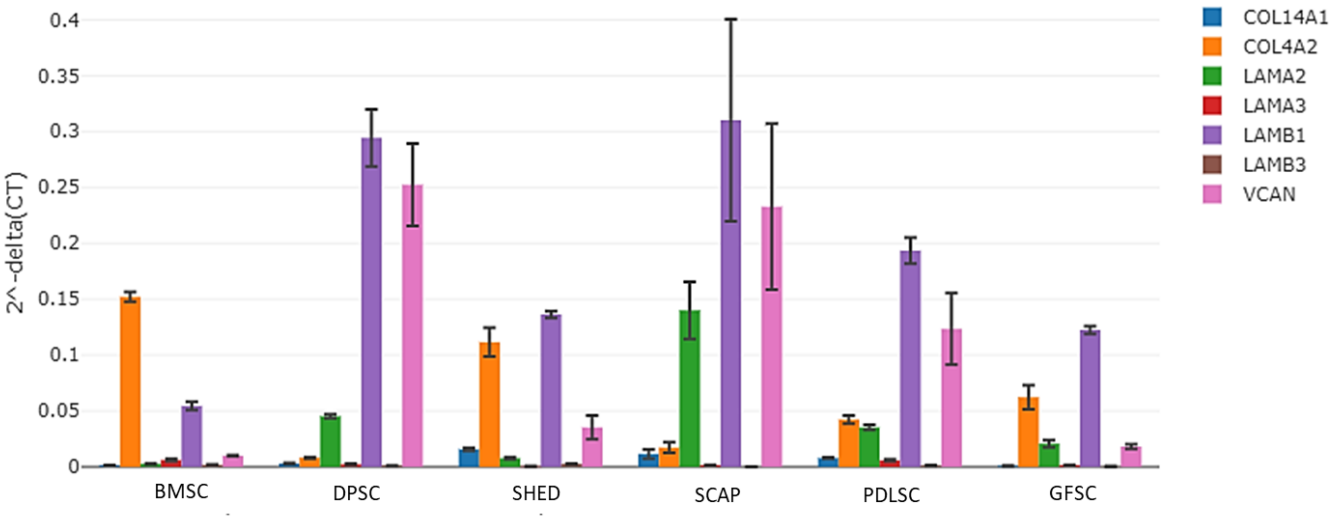
Таблица 2. Процентна експресия на маркери в стволови клетки от орален произход. *Червено - cell count >10<20% ; Оранжево – cell count >20<50%; Зелено - cell count above 50%.* BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа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

5.2 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.

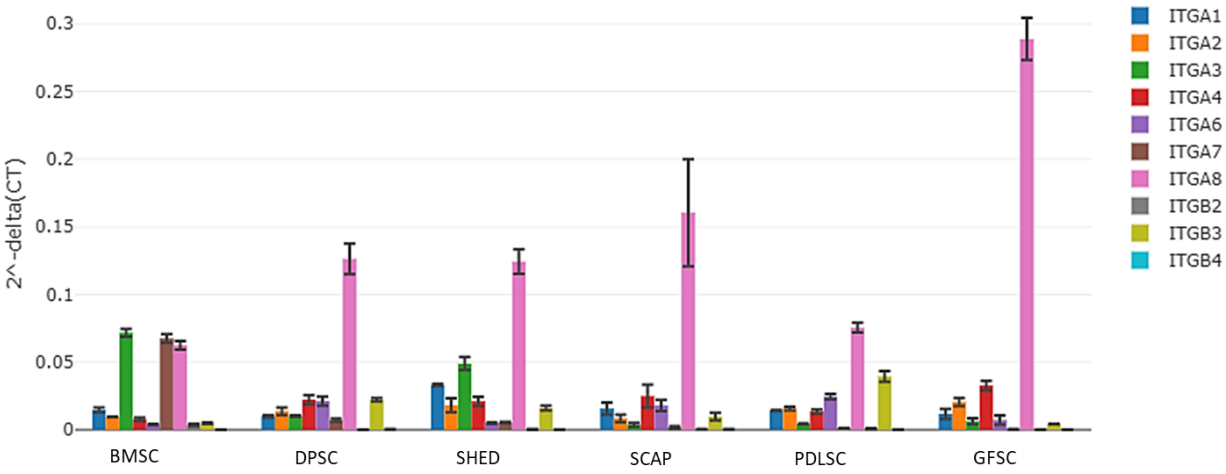
1. *Молекулите на клетъчната адхезия включват трансмембранни рецептори*



Фигура 8. 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 8 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.

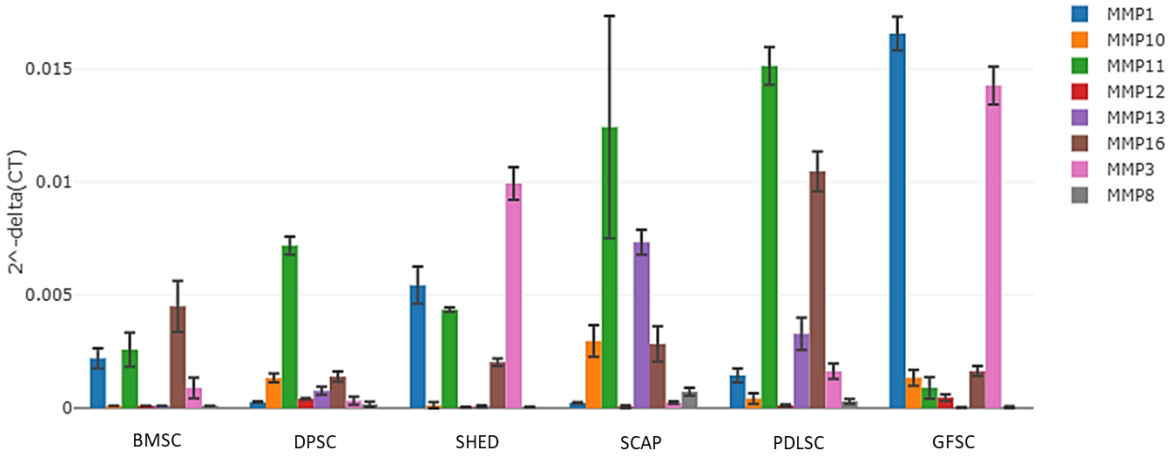
2. *Клетъчно-клетъчни адхезионни гени и интегрини*



Фигура 9. 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 9. 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.

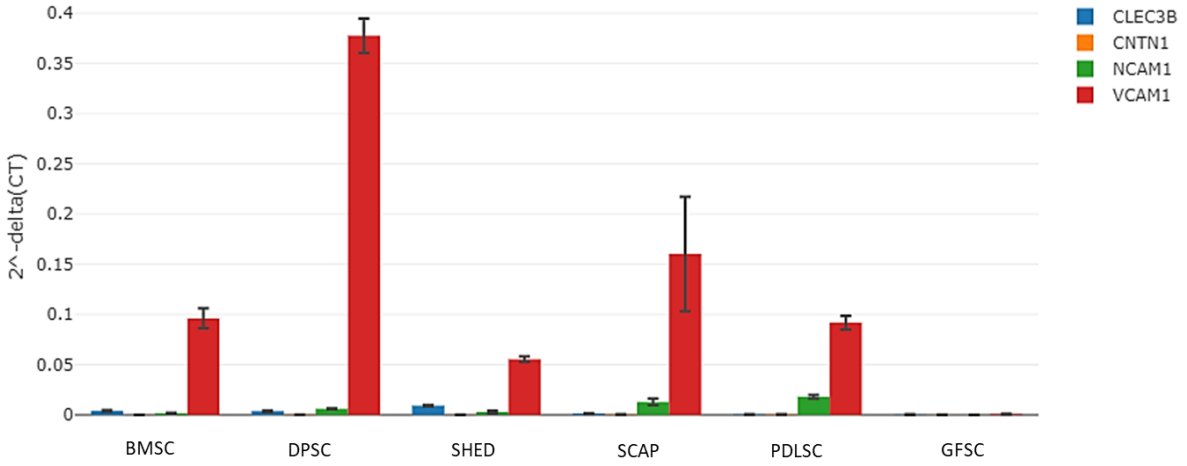
3. *Матриксни металопротеинази (MMP) и тъканни инхибитори на металопроеинази (TIMPs)*



Фигура 10. 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 10 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.

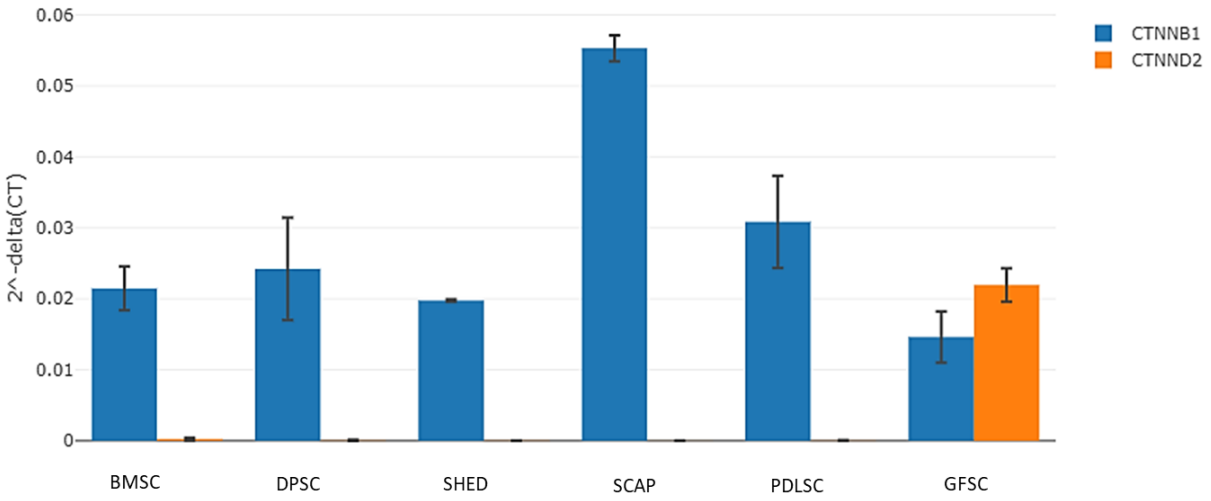
4. *Клетъчни адхезивни молекули участващи при директни клетъчни контакти*



Фигура 11. 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 11 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

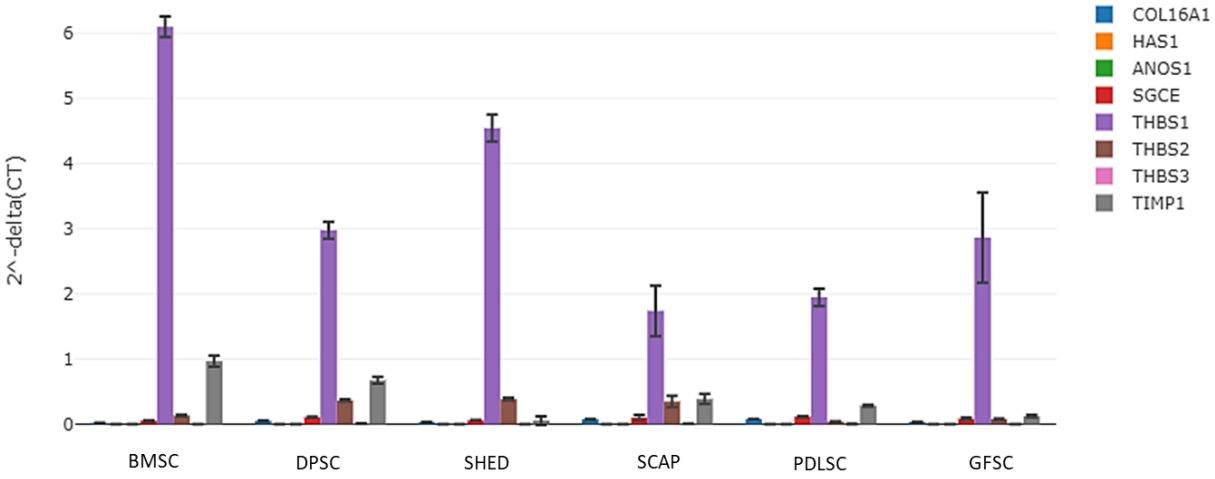
5. *Клетъчна сигнализация и трансдукционни гени*



Фигура 12. 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 12, като SCAP е с най-висока експресия. Докато CTNND2 се експресира само от GMSC.

6. *Други ECM молекули*

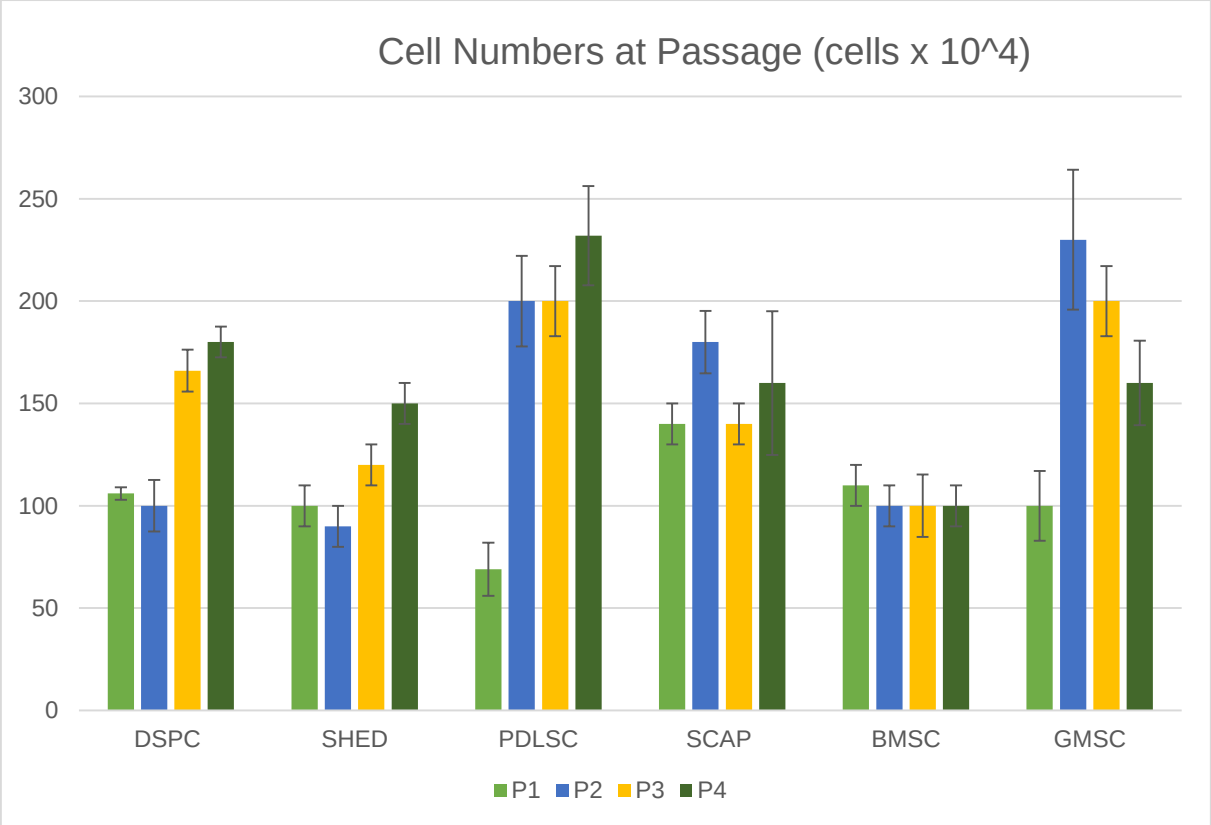


Фигура 13. Експресия на други ECM молекули; BMSC - *Мезенхимните стволови клетки от костен мозък,* DPSC - *Стволови клетки от зъбна пулпа,* SHED - *Стволови клетки от пулпа на временни зъби,* PDLSC - *Стволови клетки от пародонтален лигамент,* SCAP - *Стволови клетки от апикалната папила*, GMSC - *Гингивални мезенхимни стволови клетки*

На фигура 13 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

5.3 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 14. 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 14. 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.

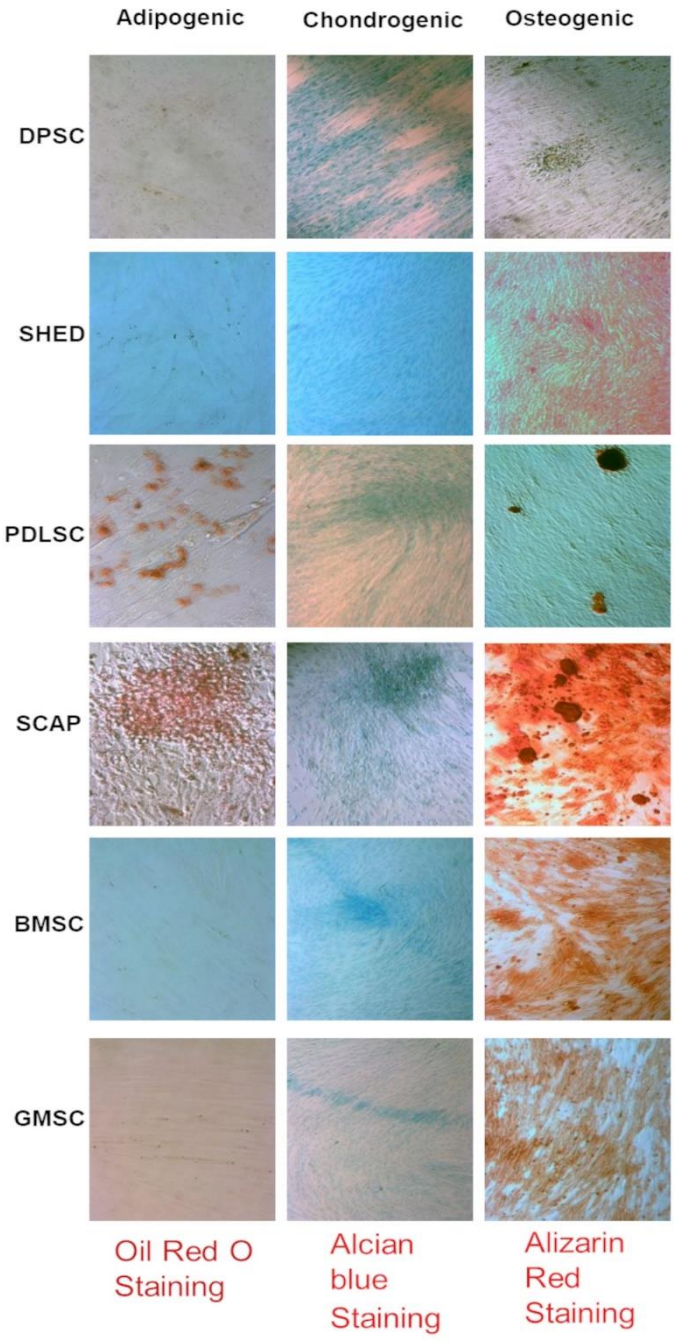
От друга страна, SCAP и GMSC проявяват най-висок пролиферативен капацитет в ранните пасажи, като достигат върха си във втория пасаж. Този резултат може да бъде свързан с техните особени характеристики и произход от различни тъкани, което може да има влияние върху тяхната скорост на пролиферация и потенциала 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 3).

5.4 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 15 представя подробно състоянието на клетките след 10-дневно култивиране в специално разработена среда с добавени активни съставки.



Фигура 15.
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;
Увеличение x5

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.

6. 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 (323). 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 (324-331). 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 (332) сравняват GMSC със зъбния фоликул и Qu et al (333) 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 (334). 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 (335,336). 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.

6.1. 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 (337). 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 (338). CD44, мезенхимен маркер, който е от решаващо значение за адхезията в хиалуроновата матрица, също е свързан с епителен-мезенхимния преход (339). Той е силно експресиран в GMSC , SHED и PDLSC, но не и в SCAP (340). 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 (341). 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 (342). 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 (343). 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,(344) докато CD146/MCAM играе решаваща роля в остеогенната диференциация и образуването на кост (345). CD271 е специфичен маркер за характеризиране и пречистване на човешки MSCs на костен мозък (346) и CD117 се счита за маркер за ангиогенни стволови клетки, експресиран от всички наши клетъчни типове в различна степен (347). Sox 9, транскрипционен фактор, експресиран по време на хондрогенезата, поддържа своята експресия при възрастни, без да се ограничава до ембрионалното развитие (348). Oct 3/4 е друг маркер на стволови клетки, свързан с ранното клетъчно развитие и плурипотентните характеристики (349). Nestin регулира производството на междинен филаментен протеин и влияе върху деленето на прогениторни клетки, особено в нервните прогениторни клетки (350). BMP4 е отговорен за ангиогенезата и

тъканната минерализация, влияейки върху различни клетъчни функции (351). FGF7, растежен фактор на фибробластите, засяга предимно мезенхимната клетъчна пролиферация, миграция и диференциация (352). 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 (353). SCAP показа повишени нива на CD49f, които са от решаващо значение за остеогенната диференциация,(354) докато DPSC увеличи експресията на CD146 и Sox 9, свързана с ембрионалното развитие и плурипотентността (355). 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 (356). 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 (357). 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 (358).

6.2 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 (359). 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 (360).

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. (361)

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. Взаимодействия 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 (362).

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 (363).

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 (364).

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. (369-372). Друга специфична комбинация от субединици на интегрините е αvβ5 интегрин, който във фибробластна клетъчна култура повишава експресията на гена α2(I) collagen (373). Докато при подтискане/супресия/инхибиране на β3 интегриновата субединица при фибробластитесе намаляват нивата на експресията на колаген I (374).

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 (375). 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 E 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 (376). 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

6.3 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.

6.4 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, (377) 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 (378). 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 (379). 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 (380,381). 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.

7. 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.

8.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

9.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

10.Библиография

1.Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and Functional Properties of Human Bone Marrow Mesenchymal Progenitor Cells. Journal of Cellular Physiology. 1999 Oct;181(1):67–73.

2.Liao L, Shi B, Chang H, Su X, Zhang L, Bi C, et al. Heparin improves BMSC cell therapy: Anticoagulant treatment by heparin improves the safety and therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cell cytotherapy. Theranostics [Internet]. 2017;7(1):106–16.

3.Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal Stem Cell therapy: Two Steps forward, One Step Back. Trends in Molecular Medicine [Internet]. 2010 May;16(5):203–9. Available from: https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(10)00024-9

4. 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;

5. Dassule HR, McMahon AP. Analysis of Epithelial–Mesenchymal Interactions in the Initial Morphogenesis of the Mammalian Tooth. Developmental Biology. 1998 Oct;202(2):215–27.

6.Harris EF. Odontogenesis. A Companion to Dental Anthropology. 2015 Oct 16;1st Edition:142–58.

7. Dupin E, Calloni GW, Le Douarin NM. The Cephalic Neural Crest of Amniote Vertebrates Is Composed of a Large Majority of Precursors Endowed with neural, melanocytic, Chondrogenic and Osteogenic Potentialities. Cell Cycle. 2010 Jan 15;9(2):238–49.

8. Mozaffari MS, Emami G, Khodadadi H, Baban B. Stem Cells and Tooth regeneration: Prospects for Personalized Dentistry. EPMA Journal. 2019 Jan 7;10(1):31–42.

9. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000 Nov 21;97(25):13625–30.

10. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003 Apr 25;100(10):5807–12.

11. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Mark Bartold P, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. The Lancet. 2004 Jul;364(9429):149–55.

12. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. Journal of Endodontics. 2008 Feb;34(2):166–71.

13. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of Stem Cells in the Dental Follicle. Journal of Dental Research. 2008 Aug;87(8):767–71.

14. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. Stem Cell Reviews. 2008 Mar;4(1):65–5.

15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science (New York, NY). 1999;284(5411):143–7.

16. Vasandan AB, Shankar SR, Prasad P, Sowmya Jahnavi V, Bhonde RR, Jyothi Prasanna S. Functional Differences in Mesenchymal Stromal Cells from Human Dental Pulp and Periodontal Ligament. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2014 Jan 3;18(2):344–54.

17. Kunimatsu R, Nakajima K, Awada T, Tsuka Y, Abe T, Ando K, et al. Comparative Characterization of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth, Dental pulp, and Bone Marrow–derived Mesenchymal Stem Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018 Jun;501(1):193–8.

18. Lei T, Zhang X, Chen P, Li Q, Du H. Proteomic Profile of Human Dental Follicle Stem Cells and Apical Papilla Stem Cells. Journal of Proteomics. 2021 Jan;231:103928.

19. Martyna Smeda, Galler KM, Woelflick M, Rosendahl A, Moehle C, Lenhardt B, et al. Molecular Biological Comparison of Dental Pulp- and Apical Papilla-Derived Stem Cells. International Journal of Molecular Sciences. 2022 Feb 27;23(5):2615–5.

20.Cao C, Maska B, Malik MA, Tagett R, Kaigler D. Immunomodulatory Differences between Mesenchymal Stem Cells from Different Oral Tissues. Heliyon. 2024 Jan 1;10(1):e23317–7.

21. Tian X, Wei W, Cao Y, Ao T, Huang F, Javed R, et al. Gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes are immunosuppressive in preventing collagen-induced arthritis. Journal of Cellular and Molecular Medicine [Internet]. 2021 Dec 24;26(3):693–708. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8817124/

22. Ji Y, Jiang W, Zeng F, Zou D, Li S, Zhang X, et al. Characterization of Canine Gingival-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Exosomes. Journal of Veterinary Dentistry. 2023 Oct 16;

23. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem Cells in Dentistry – Part I: Stem Cell Sources. Journal of Prosthodontic Research [Internet]. 2012 Jul 1;56(3):151–65. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1883195812000606

24. Li B, Ouchi T, Cao Y, Zhao Z, Men Y. Dental-Derived Mesenchymal Stem Cells: State of the Art. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021 Jun 22;9.

25. Sperber GH, Sperber SM, Guttmann GD. Craniofacial Embryogenetics and Development. Shelton, Ct: People's Medical Pub. House Usa; 2010.

26. Lee JD, Anderson KV. Morphogenesis of the Node and notochord: the Cellular Basis for the Establishment and Maintenance of left-right Asymmetry in the Mouse. Developmental Dynamics [Internet]. 2008 Dec [cited 2019 Sep 14];237(12):3464–76. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2593123/

27. Guo R, Xing QS. Roles of Wnt Signaling Pathway and ROR2 Receptor in Embryonic Development: An Update Review Article. Epigenetics Insights. 2022 Jan;15:251686572110642.

28. Aoto K, Shikata Y, Imai H, Matsumaru D, Tokunaga T, Shioda S, et al. Mouse Shh is required for prechordal plate maintenance during brain and craniofacial morphogenesis. Developmental Biology. 2009 Mar;327(1):106–20.

29. Johnston MC, Bronsky PT. Prenatal Craniofacial Development: New Insights on Normal and Abnormal Mechanisms. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 1995 Oct;6(4):368–422.

30. Endo Y, Ishiwata-Endo H, Yamada Kenneth M. Extracellular Matrix Protein Anosmin Promotes Neural Crest Formation and Regulates FGF, BMP, and WNT Activities. Developmental Cell. 2012 Aug;23(2):305–16.

31. Pispa J, Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. Developmental Biology [Internet]. 2003 Oct 15;262(2):195–205. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160603003257

32. Steventon B, Araya C, Linker C, Kuriyama S, Mayor R. Differential Requirements of BMP and Wnt Signalling during Gastrulation and Neurulation Define Two Steps in Neural Crest Induction. Development. 2009 Jan 28;136(5):771–9.

33. Sato T, Kurihara Y, Asai R, Kawamura Y, Tonami K, Uchijima Y, et al. An endothelin-1 switch specifies maxillomandibular identity. Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]. 2008 Dec 2 [cited 2020 Oct 27];105(48):18806–11. Available from: https://www.pnas.org/content/105/48/18806/tab-figures-data

34.Yoshida T, Philaiporn Vivatbutsiri, Morriss-Kay GM, Saga Y, Iseki S. Cell Lineage in Mammalian Craniofacial Mesenchyme. 2008 Sep 1;125(9-10):797–808.

35. Zamir EA, Rongish BJ, Little CD. The ECM Moves during Primitive Streak Formation—Computation of ECM versus Cellular Motion. Hogan B, editor. PLoS Biology. 2008 Oct 14;6(10):e247.

36. Tanaka O. Variabilities in Prenatal Development of Orofacial system. PubMed. 1991 Jan 1;172(2):97–107.

37. Balint Joseph Orban, Surindar Nath Bhaskar. Orban’s Oral Histology and Embryology. St. Louis ... Etc.: Mosby - Year Book; 1990.

38. Пенева М, Цолова Е, Кабакчиева Р, Рашкова М. Орална Ембриология, Хистология И Биология . 2nd ed. Издателство : Изток-Запад" 2009; 2009.

39. Rhrich F, Aghoutan H. Embryological Development of Human Molars [Internet]. Human Teeth - Key Skills and Clinical Illustrations. IntechOpen; 2020.

40. Nanci A. Ten Cate’s Oral Histology, 8E. Elsevier; 2012.

41. Teaford MF, Moya Meredith Smith, Mark. Development, Function and Evolution of Teeth. Cambridge University Press; 2007.

42. Jung YH, Cho BH. Radiographic evaluation of third molar development in 6- to 24-year-olds. Imaging Science in Dentistry. 2014;44(3):185.

43.Matalová E, Lungová V, Sharpe P. Development of Tooth and Associated Structures. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. 2015;335–46.

44.Avery JK, Chiego DJ. Essentials of Oral Histology and Embryology. Mosby; 2006.

45.Bath-Balogh M, Fehrenbach MJ. Illustrated Dental Embryology, Histology, and Anatomy. Saunders; 2006.

46.Vaahtokari A, Åberg T, Jernvall J, Keränen S, Thesleff I. The Enamel Knot as a Signaling Center in the Developing Mouse Tooth. Mechanisms of Development. 1996 Jan;54(1):39–43.

47.Jernvall J, Thesleff I. Tooth Shape Formation and Tooth renewal: Evolving with the Same Signals. Development. 2012 Sep 4;139(19):3487–97.

48.Maruo N, Sakagami R, Yoshinaga Y, Okamura K, Sawa Y. Differentiation of Apical Bud Cells in a Newly Developed Apical Bud Transplantation Model Using GFP Transgenic Mice as Donor. Lee S, editor. PLOS ONE. 2016 Mar 15;11(3):e0150766.

49.DenBesten PK, D Machule, Zhang Y, Yan Q, Li W. Characterization of Human Primary Enamel Organ Epithelial Cells in Vitro. Archives of Oral Biology. 2005 Aug 1;50(8):689–94.

50.Slavkin HC. Molecular Determinants of Tooth Development: a Review. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 1990 Jan 1;1(1):1–16.

51.Sui BD, Zheng CX, Zhao WM, Xuan K, Li B, Jin Y. Mesenchymal Condensation in Tooth Development and regeneration: a Focus on Translational Aspects of Organogenesis. Physiological Reviews [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2024 Jul 22];103(3):1899–964. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36656056/

52.Wang Y, Zhao Y, Chen S, Chen X, Zhang Y, Chen H, et al. Single cell atlas of developing mouse dental germs reveals populations of CD24+ and Plac8+ odontogenic cells. Science Bulletin. 2022 Jun;67(11):1154–69.

53.Mammoto T, Mammoto A, Torisawa Y, Tat T, Gibbs A, Derda R, et al. Mechanochemical Control of Mesenchymal Condensation and Embryonic Tooth Organ Formation. Developmental Cell. 2011 Oct;21(4):758–69.

54.Mammoto T, Mammoto A, Jiang A, Jiang E, Hashmi B, Ingber DE. Mesenchymal condensation-dependent Accumulation of Collagen VI Stabilizes organ-specific Cell Fates during Embryonic Tooth Formation. Developmental Dynamics. 2015 Apr 24;244(6):713–23.

55.Jussila M, Thesleff I. Signaling Networks Regulating Tooth Organogenesis and Regeneration, and the Specification of Dental Mesenchymal and Epithelial Cell Lineages. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology [Internet]. 2012 Mar 13 [cited 2019 Nov

20];4(4):a008425–5. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312678/

56.Seidel K, Ahn CP, Lyons D, Nee A, Ting K, Brownell I, et al. Hedgehog signaling regulates the generation of ameloblast progenitors in the continuously growing mouse incisor. Development. 2010 Nov 15;137(22):3753–61.

57.Wen Q, Jing J, Han X, Feng J, Yuan Y, Ma Y, et al. *Runx2*Regulates Mouse Tooth Root Development via Activation ofWNTInhibitor*NOTUM*. Journal of Bone and Mineral Research. 2020 Aug 3;35(11):2252–64.

58.Alghadeer A, Hanson-Drury S, Patni AP, Ehnes DD, Zhao YT, Li Z, et al. Single-cell census of human tooth development enables generation of human enamel. Developmental Cell [Internet]. 2023 Aug 11;S1534-5807(23)00360X. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37582367/

59.Mitsiadis TA, Pagella P, Gomes Rodrigues H, Tsouknidas A, Ramenzoni LL, Radtke F, et al. Notch Signaling Pathway in Tooth Shape Variations Throughout Evolution. Cells [Internet]. 2023 Feb 27 [cited 2023 Dec 6];12(5):761. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36899896/#:~:text=Evolutionary%20changes%20in%20vertebrates%20are

60.Blankenship-Sefczek EC, Goodman AH, Hubbe M, Hunter JP, Guatelli-Steinberg D. Nutritional supplementation, Tooth Crown size, and Trait Expression in Individuals from Tezonteopan, Mexico. PLoS ONE. 2024 Jun 6;19(6):e0305123–3.

61.Chapple SA, Skinner MM. A Tooth Crown Morphology Framework for Interpreting the Diversity of Primate Dentitions. Evolutionary Anthropology. 2023 Jul 24;32(5):240–55.

62.Li H, Hu X, Zen A, Chen Y, Yang M, Zhang J, et al. Transcriptomic Network Regulation of Rat Tooth Germ from Bell Differentiation Stage to Secretory Stage: MAPK Signaling Pathway Is Crucial to Extracellular Matrix Remodeling. BioMed Research International. 2023 Feb 11;2023:1–17.

63.Luo X, Feng W, Huang S, Miao S, Jiang T, Lei Q, et al. Odontoblasts release exosomes to regulate the odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells. Stem Cell Research & Therapy. 2023 Jul 8;14(1).

64.Yong-Hee Patricia Chun, Tan C, Villanueva O, Colley ME, Quintanilla TJ, Basiouny MS, et al. Overexpression of ameloblastin in secretory ameloblasts results in demarcated, hypomineralized opacities in enamel. Frontiers in Physiology. 2024 Jan 11;14.

65.Lee M, Yoon Seon Lee, Shon WJ, Park JC. Physiologic Dentin regeneration: Its past, present, and Future Perspectives. Frontiers in physiology. 2023 Dec 11;14.

66.Bi F, Tang H, Zhang Z, Lyu Y, Huo F, Chen G, et al. Hertwig's Epithelial Root Sheath Cells Show Potential for Periodontal Complex Regeneration. Journal of Periodontology. 2022 Aug;

67.Sun K, Yu M, Wang J, Zhao H, Liu H, Feng H, et al. A Wnt10a-Notch signaling axis controls Hertwig's epithelial root sheath cell behaviors during root furcation patterning. International Journal of Oral Science. 2024 Mar 13;16(1).

68.Jeong JK, Kim TH, Choi H, Cho ES. Impaired Breakdown of Herwig's Epithelial Root Sheath Disturbs Tooth Root Development. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2024 Apr 27];253(4):423–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37850829/

69.Luan X, Ito Y, Diekwisch TGH. Evolution and Development of Hertwig's Epithelial Root Sheath. Developmental Dynamics. 2006;235(5):1167–80.

70.Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, et al. Role of Hertwig's Epithelial Root Sheath Cells in Tooth Root Development. Developmental Dynamics. 2003 Nov 24;228(4):651–63.

71.Nam H, Kim J, Park J, Park JC, Kim JW, Seo BM, et al. Expression Profile of the Stem Cell Markers in Human Hertwig's Epithelial Root sheath/Epithelial Rests of Malassez Cells. Molecules and Cells. 2011 Feb 22;31(4):355–60.

72.Li J, Parada C, Chai Y. Cellular and Molecular Mechanisms of Tooth Root Development. Development (Cambridge, England) [Internet]. 2017 Feb 1;144(3):374–84. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5341797/

73.Huang X, Bringas P, Slavkin HC, Chai Y. Fate of HERS during Tooth Root Development. Developmental Biology. 2009 Oct;334(1):22–30.

74.Nakasone N, Yoshie H. Occlusion Regulates tooth-root Elongation during Root Development in Rat Molars. European Journal of Oral Sciences. 2011 Sep 20;119(6):418–26.

75.Ohshima H. Overview : Developmental Biology of Hertwig's Epithelial Root Sheath (HERS) and Tooth Root Formation. Journal of Oral Biosciences. 2008 Jan;50(3):147–53.

76.Göran Koch, Al E. Pediatric Dentistry : a Clinical Approach. Chichester: John Wiley & Sons; 2017.

77.Yu T, Klein OD. Molecular and Cellular Mechanisms of Tooth development, Homeostasis and Repair. Development (Cambridge, England) [Internet]. 2020 Jan 24;147(2). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6983727/

78.Luder HU. Malformations of the Tooth Root in Humans. Frontiers in Physiology [Internet]. 2015 Oct 27;6. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4621611/

79.None Carla Miranda, Killian B, Mariela M. Consequences of Dental Trauma to the Primary Teeth on the Permanent Dentition. RSBO. 2013 Dec 13;9(4):457–62.

80.Al-Ani AH, Antoun JS, Thomson WM, Merriman TR, Farella M. Hypodontia: an Update on Its Etiology, Classification, and Clinical Management. BioMed Research International

[Internet]. 2017;2017:1–9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5376450/

81.Açıkgöz A, Açıkgöz G, Tunga U, Otan F. Characteristics and Prevalence of non-syndrome Multiple Supernumerary teeth: a Retrospective Study. Dentomaxillofacial Radiology. 2006 May;35(3):185–90.

82.Smith CE, A Nanci. Overview of Morphological Changes in Enamel Organ Cells Associated with Major Events in amelogenesis. PubMed. 1995 Feb 1;39(1):153–61.

83.Jane Ann Soxman, Patrice Barsamian Wunsch, Haberland CM. Tooth Development. Springer eBooks. 2018 Dec 15;1–6.

84.Adriano Piattelli, Paolo Trisi. Morphodifferentiation and Histodifferentiation of the Dental Hard Tissues in Compound odontoma: a Study of Undemineralized Material. Journal of Oral Pathology & Medicine. 1992 Sep 1;21(8):340–2.

85.Hasegawa M, Tanaka R, Zhong J, Kobayashi M, Manabe A, Shibata Y. Deciphering Load Attenuation Mechanisms of the dentin-enamel junction: Insights from a Viscoelastic Constitutive Model. Acta Biomaterialia. 2023 Nov 1;171:193–201.

86.Kondo S, Morita W, Ohshima H. The Biological Significance of Tooth Identification Based on Developmental and Evolutional Viewpoints. Journal of Oral Biosciences [Internet]. 2022 Sep 1;64(3):287–302. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1349007922000895

87.Sella Tunis T, Sarne O, Hershkovitz I, Finkelstein T, Pavlidi AM, Shapira Y, et al. Dental Anomalies' Characteristics. Diagnostics. 2021 Jun 25;11(7):1161.

88.Benson PE, Atwal A, Bazargani F, Parkin N, Thind B. Interventions for Promoting the Eruption of Palatally Displaced Permanent Canine teeth, without the Need for Surgical exposure, in Children Aged 9 to 14 Years. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2021 Dec 30;2022(1).

89.Yordanova-Kostova GR, Grancharov MV, Gurgurova GD. Abnormality in the Morphogenesis of Tooth Development and Relationship with Orthodontic Deformities and Treatment Approaches. Case Reports in Dentistry [Internet]. 2021 Nov 5;2021:e1183504. Available from: https://www.hindawi.com/journals/crid/2021/1183504/

90.Alotaibi RN, Howe BJ, Moreno Uribe LM, Sanchez C, Deleyiannis FWB, Padilla C, et al. Genetic Analyses of Enamel Hypoplasia in Multiethnic Cohorts. Human Heredity. 2022;87(2):34–50.

91.Shamszadeh S, Shirvani A, Torabzadeh H, Asgary S. Effects of Growth Factors on the Differentiation of Dental Stem Cells: a Systematic Review and Meta-analysis. Current Stem Cell Research & Therapy. 2022 Jun 28;17.

92.Chen J, Sun T, You Y, Lin B, Wu B, Wu J. Genome-wide Identification of Potential Odontogenic Genes Involved in the Dental epithelium-mesenchymal Interaction during Early Odontogenesis. BMC Genomics. 2023 Apr 3;24(1).

93.Svandova E, Peterkova R, Matalova E, Lesot H. Formation and Developmental Specification of the Odontogenic and Osteogenic Mesenchymes. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020 Jul 17;8.

94.Lin C, Ruan N, Li L, Chen Y, Hu X, Chen Y, et al. FGF8-mediated Signaling Regulates Tooth Developmental Pace during Odontogenesis. Journal of Genetics and Genomics. 2022 Jan;49(1):40–53.

95.Gudrun von Scheven, Lúcia Elvira Alvares, Mootoosamy RC, Dietrich S. Neural Tube Derived Signals and Fgf8 Act Antagonistically to Specify Eye versus Mandibular Arch Muscles. Development. 2006 Jul 15;133(14):2731–45.

96.Tucker AS, Yamada G, Grigoriou M, Pachnis V, Sharpe PT. Fgf-8 Determines rostral-caudal Polarity in the First Branchial Arch. Development. 1999 Jan 1;126(1):51–61.

97.Rungarun Kriangkrai, Iseki S, Eto K, Suconta Chareonvit. Dual Odontogenic Origins Develop at the Early Stage of Rat Maxillary Incisor Development. Anatomy and Embryology. 2006 Jan 17;211(2):101–8.

98.Bellusci S, Henderson R, Winnier G, Oikawa T, Hogan BL. Evidence from Normal Expression and Targeted Misexpression That Bone Morphogenetic Protein (Bmp-4) Plays a Role in Mouse Embryonic Lung Morphogenesis. Development. 1996 Jun 1;122(6):1693–702.

99.Zhang Y, Zhang Z, Zhao X, Yu X, Hu Y, Geronimo B, et al. A New Function of BMP4: Dual Role for BMP4 in Regulation of Sonic Hedgehog Expression in the Mouse Tooth Germ. Development. 2000 Apr 1;127(7):1431–43.

100. Haeckel E. *Historie de La créacion dês etres organisés.* 3rd ed. Paris: Librairie C. Reinwald; 1903.

101.Familari M, Selwood L. The Potential for Derivation of Embryonic Stem Cells in Vertebrates. Molecular Reproduction and Development. 2005;73(1):123–31.

102.Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. The Journal of pathology [Internet]. 2002 Jun 27;197(4):419–23. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115858

103.Thomas ED. Stem Cell transplantation: Past, Present and Future. Stem Cells. 1994;12(6):539–44.

104.Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic Stem Cells. Cell Proliferation [Internet]. 2004 Feb;37(1):23–34. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2184.2004.00298.x

105.Wobus AM. Potential of Embryonic Stem Cells. Molecular Aspects of Medicine. 2001 Jun;22(3):149–64.

106.Ariff Bongso, Eng Hin Lee. Stem cells : from bench to bedside. Singapore ; Hackensack, Nj: World Scientific, Cop; 2011.

107.Condic ML. Totipotency: What It Is and What It Is Not. Stem Cells and Development [Internet]. 2014 Apr 15;23(8):796–812. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991987/

108.Martí M, Mulero L, Pardo C, Morera C, Carrió M, Laricchia-Robbio L, et al. Characterization of pluripotent stem cells. Nature Protocols [Internet]. 2013 Jan 10;8(2):223–53. Available from: https://www.nature.com/articles/nprot.2012.154#anticipated-results

109.Mirzaei H, Sahebkar A, Sichani LS, Moridikia A, Nazari S, Sadri Nahand J, et al. Therapeutic application of multipotent stem cells. Journal of Cellular Physiology. 2017 Jun 22;233(4):2815–23.

110.Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoudé GA, Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. Nature. 2008 Oct 1;456(7219):250–4.

111.de Kretser D. Totipotent, Pluripotent or Unipotent Stem cells: a Complex Regulatory Enigma and Fascinating biology. PubMed. 2007 Oct 1;15(2):212–8.

112.Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal Stem Cells. Cell Transplantation [Internet]. 2011 Feb;20(1):5–14. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21396235/#:~:text=Mesenchymal%20stem%20cells%20(MSCs)%20are,marrow%2C%20adipose%20tissue%2C%20etc.

113.Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune Defense Mechanisms of the Dental Pulp. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 1998 Apr;9(2):179–200.

114.Lee SM, Zhang Q, Le AD. Dental Stem Cells: Sources and Potential Applications. Current Oral Health Reports. 2014 Jan 30;1(1):34–42.

115.Mosaddad SA, Rasoolzade B, Namanloo RA, Azarpira N, Dortaj H. Stem Cells and Common Biomaterials in dentistry: a Review Study. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2022 Jun 18;33(7)..

116.Chiu RCJ . Bone-Marrow Stem Cells as a Source for Cell Therapy. Heart Failure Reviews. 2003;8(3):247–51.

117.Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal Stem Cell perspective: Cell Biology to Clinical Progress. npj Regenerative Medicine. 2019 Dec;4(1).

118.Winning L, El Karim IA, Lundy FT. A Comparative Analysis of the Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells and Development. 2019 Aug;28(15):1050–8.

119.Park JY, Jeon HJ, Kim TY, Lee KY, Park K, Lee ES, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cell surface marker expression for human dental mesenchymal stem cells. Regenerative Medicine. 2013 Jul;8(4):453–66.

120.Shi S, Bartold P, Miura M, Seo B, Robey P, Gronthos S. The Efficacy of Mesenchymal Stem Cells to Regenerate and Repair Dental Structures. Orthodontics and Craniofacial Research. 2005 Aug;8(3):191–9.

121.Ferro F, Spelat R, Baheney CS. Dental Pulp Stem Cell (DPSC) Isolation, Characterization, and Differentiation. Stem Cells and Tissue Repair. 2014;91–115.

122.Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Gervois P, Wolfs E, Lambrichts I. The Angiogenic Potential of DPSCs and SCAPs in an In Vivo Model of Dental Pulp Regeneration. Stem Cells International. 2017;2017:1–14.

123.Nakashima M, Iohara K, Murakami M. Dental pulp stem cells and regeneration. Endodontic Topics. 2013 Mar;28(1):38–50.

124.Irfan M, Kim JH, Marzban H, Reed DA, George A, Cooper LF, et al. The role of complement C5a receptor in DPSC odontoblastic differentiation and in vivo reparative dentin formation. International Journal of Oral Science. 2022 Jan 27;14(1).

125.Apel C, Buttler P, Salber J, Dhanasingh A, Neuss S. Differential mineralization of human dental pulp stem cells on diverse polymers. Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik. 2018 Jun 27;63(3):261–9.

126.Núñez-Toldrà R, Martínez-Sarrà E, Gil-Recio C, Carrasco M, Ashraf Al Madhoun, Sheyla Montori, et al. Dental pulp pluripotent-like stem cells (DPPSC), a new stem cell population with chromosomal stability and osteogenic capacity for biomaterials evaluation. BMC Cell Biology. 2017 Apr 21;18(1).

127.Fatameh Shariati, Raha Favaedi, Fariba Ramazanali, Pegah Ghoraeian, Parvaneh Afsharian, Behrouz Aflatoonian, et al. Increased expression of stemness genes Rex-1, Oct-4, Nanog, and Sox-2 in women with ovarian endometriosis versus normal endometrium: A case-control study. International Journal of Reproductive BioMedicine (IJRM). 2019 Jan 27;16(12):783–3.

128.Vivien Thiemy Sakai, Zhang ZP, Zhang R, Neiva KG, Aparecida M, Shi SS, et al. SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. Journal of Dental Research. 2010 Apr 15;89(8):791–6.

129.Atlas Y, Gorin C, Novais A, Marchand M, Eirini Chatzopoulou, Lesieur J, et al. Microvascular maturation by mesenchymal stem cells in vitro improves blood perfusion in implanted tissue constructs. 2021 Jan 1;268:120594–4.

130.Viale-Bouroncle S, Gosau M, Küpper K, Möhl C, Brockhoff G, Reichert TE, et al. Rigid matrix supports osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). Differentiation. 2012 Dec;84(5):366–70.

131.Su WT, Wu PS, Ko CS, Huang TY. Osteogenic differentiation and mineralization of human exfoliated deciduous teeth stem cells on modified chitosan scaffold. Materials Science and Engineering: C. 2014 Aug;41:152–60.

132.Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. Journal of Clinical Periodontology. 2011 Mar 30;38(8):721–31.

133.Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, Marchisio M, Mazzon E, Paganelli R, et al. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. Stem Cells and Development. 2019 Aug;28(15):995–1003.

134.Liu J, Zhao Z, Ruan J, Weir MD, Ma T, Ren K, et al. Stem cells in the periodontal ligament differentiated into osteogenic, fibrogenic and cementogenic lineages for the regeneration of the periodontal complex. Journal of Dentistry [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Apr 13];92:103259. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300571219302696?via%3Dihub

135.Kawahara T, Yamashita M, Ikegami K, Nakamura T, Yanagita M, Yamada S, et al. TGF-Beta Negatively Regulates the BMP2-Dependent Early Commitment of Periodontal Ligament Cells into Hard Tissue Forming Cells. Genetos DC, editor. PLOS ONE. 2015 May 13;10(5):e0125590.

136.Iwasaki K, Akazawa K, Nagata M, Komaki M, Honda I, Morioka C, et al. The Fate of Transplanted Periodontal Ligament Stem Cells in Surgically Created Periodontal Defects in Rats. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2019 Jan 7 [cited 2019 Nov 18];20(1):192. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337301/

137.Nada OA, El Backly RM. Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology [Internet]. 2018 Jul 24 [cited 2022 Aug 16];6. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6066565/

138.Wu J, Huang GTJ ., He W, Wang P, Tong Z, Jia Q, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Enhances Stemness of Human Stem Cells from the Apical Papilla. Journal of Endodontics. 2012 May;38(5):614–22.

139.Kang J, Fan W, Deng Q, He H, Huang F. Stem Cells from the Apical Papilla: A Promising Source for Stem Cell-Based Therapy. BioMed Research International. 2019 Jan 29;2019:1–8.

140.Tziafas D, Kodonas K. Differentiation Potential of Dental Papilla, Dental Pulp, and Apical Papilla Progenitor Cells. Journal of Endodontics. 2010 May;36(5):781–9.

141.Chen K, Xiong H, Huang Y, Liu C. Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs). Archives of Oral Biology. 2013 Aug;58(8):997–1006.

142.Yu S, Zhao Y, Ma Y, Ge L. Profiling the Secretome of Human Stem Cells from Dental Apical Papilla. Stem Cells and Development. 2016 Mar 15;25(6):499–508.

143.Lin X, Li Q, Hu L, Jiang C, Wang S, Wu X. Apical Papilla Regulates Dental Follicle Fate via the OGN-Hh Pathway. Journal of Dental Research. 2022 Dec 14;102(4):431–9.

144.Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, Nova-Lamperti E, Luz PA, Fierro FS, et al. Culture and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Gingival Tissue. Journal of Periodontology. 2010 Jun;81(6):917–25.

145.Venkatesh D, Kumar KS, Alur JB. Gingival mesenchymal stem cells. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology [Internet]. 2017 May 1 [cited 2023 Apr 24];21(2):296–6. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5596684/

146.Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. The Journal of Immunology. 2009 Nov 18;183(12):7787–98.

147.Sun Q, Nakata H, Yamamoto M, Kasugai S, Kuroda S. Comparison of gingiva-derived and bone marrow mesenchymal stem cells for osteogenesis. Journal of Cellular and Molecular Medicine [Internet]. 2019 Sep 10 [cited 2023 May 11];23(11):7592–601. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6815943/

148.Murugan Girija D, Y Ranga Rao S, Kalachaveedu M, Subbarayan R. Osteogenic differentiation of human gingival mesenchymal stem cells byAristolochia bracteolatasupplementation through enhanced Runx2 expression. Journal of Cellular Physiology. 2017 Feb 21;232(7):1591–5.

149.Li J, Xu S, Zhang K, Zhang W, Liu H, Xu Z, et al. Treatment of gingival defects with gingival mesenchymal stem cells derived from human fetal gingival tissue in a rat model. Stem Cell Research & Therapy. 2018 Feb 5;9(1).

150.Barilani M, Banfi F, Sironi S, Ragni E, Guillaumin S, Polveraccio F, et al. Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor (CD271) Heterogeneous Expression in Adult and Fetal Mesenchymal Stromal Cells. Scientific Reports [Internet]. 2018 Jun 18 [cited 2021 Mar 19];8(1):9321. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-018-27587-8#Sec8

151.Ballotti R. Identification of melanoma initiating cells: does CD271 have a future? Future Oncology. 2015 Jun;11(11):1587–90.

152.Li S, Yue D, Chen X, Wang L, Li J, Yu P, et al. Epigenetic regulation of CD271, a potential cancer stem cell marker associated with chemoresistance and metastatic capacity. Oncology Reports. 2014 Oct 24;33(1):425–32.

153.Krebsbach PH, Villa-Diaz LG. The Role of Integrin α6 (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. Stem Cells and Development. 2017 Aug;26(15):1090–9.

154.Yu KR, Yang SR, Jung JW, Kim H, Ko K, Han DW, et al. CD49f Enhances Multipotency and Maintains Stemness Through the Direct Regulation of OCT4 and SOX2. STEM CELLS. 2012 Apr 9;30(5):876–87.

155.Lin G, Liu G, Banie L, Wang G, Ning H, Lue TF, et al. Tissue Distribution of Mesenchymal Stem Cell Marker Stro-1. Stem Cells and Development. 2011 Oct;20(10):1747–52.

156.Gronthos S, Andrew C.W. Zannettino, Graves SE, Ohta S, Hay S, Simmons PJ. Differential Cell Surface Expression of the STRO-1 and Alkaline Phosphatase Antigens on

Discrete Developmental Stages in Primary Cultures of Human Bone Cells. Journal of Bone and Mineral Research. 1999 Jan 1;14(1):47–56.

157.Morad Bensidhoum, Chapel A, François S, Christelle Demarquay, Christelle Mazurier, L. Fouillard, et al. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. Blood. 2004 May 1;103(9):3313–9.

158.Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, Akagawa H, Hashiguchi K, Nakajima T, et al. Collagen Type I α2 (*COL1A2*) Is the Susceptible Gene for Intracranial Aneurysms. Stroke. 2004 Feb;35(2):443–8.

159.Büttner C, Skupin A, Rieber EP. Transcriptional activation of the type I collagen genes COL1A1 and COL1A2 in fibroblasts by interleukin-4: analysis of the functional collagen promoter sequences. Journal of Cellular Physiology [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2023 May 15];198(2):248–58. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14603527/

160.Byers PH. Inherited disorders of collagen gene structure and expression. American Journal of Medical Genetics. 1989 Sep;34(1):72–80.

161.Kuivaniemi H, Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. Gene [Internet]. 2019 Jul 30;707:151–71.

162.Frank M, Albuisson J, Ranque B, Golmard L, Mazzella JM, Bal-Theoleyre L, et al. The type of variants at the COL3A1 gene associates with the phenotype and severity of vascular Ehlers–Danlos syndrome. European Journal of Human Genetics [Internet]. 2015 Mar 11;23(12):1657–64.

163.Yang F, Lin L, Li X, Wen R, Zhang X. Silencing of COL3A1 represses proliferation, migration, invasion, and immune escape of triple negative breast cancer cells via down-regulating PD-L1 expression. Cell Biology International. 2022 Aug 5;46(11):1959–69.

164.PIEPER FR, DE V, RAATS JM, HENDERIK JB, Gert SCHAART, RAMAEKERS FC, et al. Regulation of vimentin expression in cultured epithelial cells. European Journal of Biochemistry. 1992 Dec 1;210(2):509–19.

165.Paulin D, Lilienbaum A, Kardjian S, Agbulut O, Li Z. Vimentin: Regulation and pathogenesis. Biochimie. 2022 Feb;

166.Usman S, Waseem NH, Nguyen TKN, Mohsin S, Jamal A, Teh MT, et al. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. Cancers. 2021 Oct 5;13(19):4985.

167.Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, et al. Nestin expression ? a property of multi-lineage progenitor cells? Cellular and Molecular Life Sciences. 2004 Oct;61(19-20):2510–22.

168.Gilyarov AV. Nestin in central nervous system cells. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2008 Feb;38(2):165–9.

169.Williams K, Motiani K, Giridhar PV, Kasper S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. Experimental Biology and Medicine. 2013 Mar;238(3):324–38.

170.Thomas L, H. Randolph Byers, Vink J, Stamenkovic I. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. Journal of Cell Biology. 1992 Aug 15;118(4):971–7.

171.Pisterna GV, Siragusa M. CD44 Presence in Inflamed Pulp Tissue. Journal of Endodontics. 2007 Oct;33(10):1203–7.

172.Kawai T, K. Yasuchika, Ishii T, Katayama H, E.Y. Yoshitoshi, S. Ogiso, et al. Cytokeratin 19, a Cancer Stem Cell Marker in Hepatocellular Carcinoma. Annals of Oncology. 2014 Sep 1;25:iv248–8.

173.Chen S, Takahara M, Kido M, Takeuchi S, H. Uchi, Tu Y, et al. Increased expression of an epidermal stem cell marker, cytokeratin 19, in cutaneous squamous cell carcinoma. British Journal of Dermatology. 2008 Oct 1;159(4):952–5.

174.Doğan A, Demirci S, Şahin F. In vitro differentiation of human tooth germ stem cells into endothelial- and epithelial-like cells. Cell Biology International. 2014 Aug 14;39(1):94–103.

175.Shis IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. The Journal of Pathology . 1999 Sep;189(1):4–11.

176.Joshkon A, Heim X, Dubrou C, Bachelier R, Traboulsi W, Stalin J, et al. Role of CD146 (MCAM) in Physiological and Pathological Angiogenesis—Contribution of New Antibodies for Therapy. Biomedicines [Internet]. 2020 Dec 19;8(12):633.

177.Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. Blood. 2012 Sep 13;120(11):2330–9.

178.Xiong L, Helm EY, Dean JW, Sun N, Jimenez-Rondan FR, Zhou L. Nutrition impact on ILC3 maintenance and function centers on a cell-intrinsic CD71-iron axis. Nature Immunology [Internet]. 2023 Oct 1 [cited 2024 Mar 22];24(10):1671–84. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37709985/

179.Dong HY, Wilkes S, Yang H. CD71 is Selectively and Ubiquitously Expressed at High Levels in Erythroid Precursors of All Maturation Stages. The American Journal of Surgical Pathology. 2011 May 1;35(5):723–32.

180.Liu Q, Wang M, Hu Y, Xing H, Chen X, Zhang Y, et al. Significance of CD71 expression by flow cytometry in diagnosis of acute leukemia. Leukemia & Lymphoma. 2013 Aug 20;55(4):892–8.

181.Escribano L, Ocqueteau M, J. Sánchez Almeida, A. Orfao, Miguel. Expression of the c-kit (CD117) Molecule in Normal and Malignant Hematopoiesis. 1998 Aug 1;30(5-6):459–66.

182.Foster B, Zaidi D, Young T, Mobley M, Kerr B. CD117/c-kit in Cancer Stem Cell-Mediated Progression and Therapeutic Resistance. Biomedicines. 2018 Mar 8;6(1):31.

183.Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): A Review on Expression in Normal and Neoplastic Tissues, and Mutations and Their Clinicopathologic Correlation. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. 2005 Sep;13(3):205–20.

184.Wang H, Niu Z, Zhao S, Jin W, Gao J, Smith AJ. TGF-β activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. Archives of Oral Biology. 2004 Nov 1;49(11):911–8.

185.Lim D, Wu KC, Lee A, Saunders TL, Ritchie HH. DSPP dosage affects tooth development and dentin mineralization. PLOS ONE [Internet]. 2021 May 26 [cited 2023 Nov 3];16(5):e0250429–9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8153449/

186.Lee SK, Lee KE, Song SJ, Hyun HK, Lee SH, Kim JW. A*DSPP*Mutation Causing Dentinogenesis Imperfecta and Characterization of the Mutational Effect. BioMed Research International [Internet]. 2013;2013:1–7. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591212/

187.Abu-Remaileh M, Gerson A, Farago M, Nathan G, Alkalay I, Zins Rousso S, et al. Oct-3/4 regulates stem cell identity and cell fate decisions by modulating Wnt/β-catenin signalling. The EMBO Journal. 2010 Aug 24;29(19):3236–48.

188.Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine. 2009 Sep;1(2):228–36.

189.Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. The Journal of Biological Chemistry [Internet]. 2005 Feb 18;280(7):5307–17. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15557334/#:~:text=Oct%2D3%2F4%20is%20a

190.Chang CC, Shieh GS, Wu P, Lin CC, Shiau AL, Wu CL. Oct-3/4 Expression Reflects Tumor Progression and Regulates Motility of Bladder Cancer Cells. Cancer Research. 2008 Aug 1;68(15):6281–91.

191.Jo A, Denduluri S, Zhang B, Wang Z, Yin L, Yan Z, et al. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. Genes & Diseases. 2014 Dec;1(2):149–61.

192.Marshall OJ, Harley VR. Molecular Mechanisms of SOX9 Action. Molecular Genetics and Metabolism. 2000 Nov;71(3):455–62.

193.Pritchett J, Athwal V, Roberts N, Hanley NA, Hanley KP. Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: lessons from development. Trends in Molecular Medicine. 2011 Mar;17(3):166–74.

194.Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline Phosphatase: An Overview. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2013 Nov 26;29(3):269–78.

195.Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. Current Opinion in Orthopaedics [Internet]. 2007;18(5):444–8. Available from: http://josorge.com/publications/Citations/Bio-bio/004.pdf

196.Fernandez, NJ, Kidney BA. Alkaline phosphatase: beyond the liver. Veterinary Clinical Pathology. 2007 Sep;36(3):223–33.

197.Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. Nature Biotechnology [Internet]. 2002 Dec 1;20(12):1261–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12426580/

198.Matsukawa A, Shiozaki, Kitajima, Mazaki, Yoshida, Tanaka, et al. Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4. International Journal of Nanomedicine. 2013 Apr;1349.

199.Cagavi E, Bartulos O, Suh CY, Sun B, Yue Z, Jiang Z, et al. Functional Cardiomyocytes Derived from Isl1 Cardiac Progenitors via Bmp4 Stimulation. Pesce M, editor. PLoS ONE. 2014 Dec 18;9(12):e110752.

200.Zinkle A, Mohammadi M. Structural Biology of the FGF7 Subfamily. Frontiers in Genetics. 2019 Feb 12;10.

201.Xie Y, Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2020 Sep 2;5(1).

202.

Nunes QM, Li Y, Sun C, Kinnunen TK, Fernig DG. Fibroblast growth factors as tissue repair and regeneration therapeutics. PeerJ. 2016 Jan 12;4:e1535.

203.Brehm JM, Hagiwara K, Yohannes Tesfaigzi, Bruse S, Mariani TJ, Bhattacharya S, et al. Identification of FGF7 as a novel susceptibility locus for chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. 2011 Sep 15;66(12):1085–90.

204.Zhou C, Chen Y, Kang W, Lv H, Fang Z, Yan F, et al. Mir-455-3p-1 represses FGF7 expression to inhibit pulmonary arterial hypertension through inhibiting the RAS/ERK signaling pathway. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2019 May 1;130:23–35.

205.Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. Cell and Tissue Research. 2009 Aug 20;339(1):269–80.

206.van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. Cell and Tissue Research. 2001 Sep 1;305(3):285–98.

207.Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. Genome Biology. 2007;8(5):215.

208.Boudjadi S, Beaulieu JF. Gene Section Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology INIST-CNRS OPEN ACCESS JOURNAL ITGA1 (integrin, alpha 1). 2014;

209.Suyin Paulynn Chin, Marthick JR, West AC, Short AK, Jyoti Chuckowree, Polanowski AM, et al. Regulation of the *ITGA2* gene by epigenetic mechanisms in prostate cancer. The Prostate. 2015 Feb 7;75(7):723–34.

210.Yang W, He M, Zhao J, Wang Z. Association of ITGA3 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathological characteristics of osteosarcoma. Medical Oncology. 2014 Jan 1;31(2).

211.Khanahmad H, Tabatabaiefar M, Darzi L, Boshtam M, Shariati L, Kouhpayeh S, et al. The silencing effect of miR-30a on ITGA4 gene expression in vitro: an approach for gene therapy. Research in Pharmaceutical Sciences [Internet]. 2017 [cited 2019 May 10];12(6):456. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5691572/

212.Zhu H, Wang G, Zhu H, Xu A. ITGA5 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltration in gastrointestinal tumors. BMC Cancer. 2021 Mar 12;21(1).

213.Ferreira C, Eliane Correa-de-Santana, Ribeiro-Alves M, Tereza A, Savino W. ITGA6 gene silencing by RNA interference modulates the expression of a large number of cell migration-related genes in human thymic epithelial cells. BMC Genomics. 2013 Oct 1;14(S6).

214.Vignier N, Moghadaszadeh B, Gary F, Beckmann J, Mayer U, Guicheney P. Structure, Genetic Localization, and Identification of the Cardiac and Skeletal Muscle Transcripts of the Human Integrin α7 Gene (ITGA7). Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999 Jul;260(2):357–64.

215.Ekwa-Ekoka C, Diaz GA, Carlson C, Hasegawa T, Ram Samudrala, Kim Chew Lim, et al. Genomic organization and sequence variation of the human integrin subunit α8 gene (ITGA8). Matrix Biology. 2004 Nov 1;23(7):487–96.

216.Lu Q, Ray D, Gutsch D, Richardson B. Effect of DNA methylation and chromatin structure onITGAL expression. Blood. 2002 Jun 15;99(12):4503–8.

217.Xiaoshuo Lv, Wang F, Sun M, Sun C, Fan X, Ma B, et al. Differential Gene Expression and Immune Cell Infiltration in Carotid Intraplaque Hemorrhage Identified Using Integrated Bioinformatics Analysis. Frontiers in cardiovascular medicine. 2022 May 17;9.

218.Marcelo Moura Linhares, Renato José Affonso, Luciano, Regina S, Vinicius M, Regina S, et al. Genetic and Immunohistochemical Expression of Integrins ITGAV, ITGA6, and ITGA3 As Prognostic Factor for Colorectal Cancer: Models for Global and Disease-Free Survival. PLoS ONE. 2015 Dec 16;10(12):e0144333–3.

219.Zheng W, Jiang C, Li R. Integrin and gene network analysis reveals that ITGA5 and ITGB1 are prognostic in non-small-cell lung cancer. OncoTargets and Therapy [Internet]. 2016 Apr [cited 2021 Aug 24];2317. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27143927/

220.Yassaee VR, Hashemi-Gorji F, Boosaliki S, Parvaneh N. Mutation spectra of the ITGB2 gene in Iranian families with leukocyte adhesion deficiency type 1. Human Immunology. 2016 Feb;77(2):191–5.

221.Makhlie Zh Aslonova, GA I, Mavlyanova NN. Association of ITGB3 gene polymorphisms with the risk of developing fetal growth restriction syndrome. MOJ women's health. 2021 Aug 31;10(4):97–100.

222.Wells JPR, Amit Gaggar, J. Edwin Blalock. MMP generated matrikines. Matrix Biology. 2015 May 1;44-46:122–9.

223.MURPHY G, NAGASE H. Progress in matrix metalloproteinase research. Molecular Aspects of Medicine. 2008 Oct;29(5):290–308.

224.Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. Disease Models & Mechanisms. 2014 Feb 1;7(2):193–203.

225.S. Sandya, Achan MA, Sudhakaran PR. Multiple matrix metalloproteinases in type II collagen induced arthritis. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2009 Jan 1;24(1):42–8.

226.Yoshihara Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 2000 Jun 1;59(6):455–61.

227.Haji A, Haglund C, Virolainen S, Valtteri Häyry, Timo Atula, Risto Kontio, et al. MMP-7, MMP-8, and MMP-9 in oral and cutaneous squamous cell carcinomas. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology. 2015 Apr 1;119(4):459–67.

228.Kivelä-Rajamäki M, Maisi P, Srinivas R, Tervahartiala T, Teronen O, Husa V, et al. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. Journal of Periodontal Research. 2003 Oct 30;38(6):583–90.

229.Goncharuk V. Expression of Matrix Metalloproteinases 3, 10 and 11 (Stromelysins 1, 2 and 3) and Matrix Metalloproteinase 7 (Matrilysin) by Cancer Cells in Non-Small Cell Lung Neoplasms. Clinicopathologic Studies. 2006;42(1):16–9.

230.Matute-Bello G, Wurfel MM, Lee JS, Park DR, Frevert CW, Madtes DK, et al. Essential Role of MMP-12 in Fas-Induced Lung Fibrosis. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2007 Aug 1;37(2):210–21.

231.Wang M, Sampson ER, Jin H, Li J, Ke QH, Im HJ, et al. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. Arthritis Research & Therapy. 2013;15(1):R5.

232.Reed M. Inhibition of TIMP1 enhances angiogenesis in vivo and cell migration in vitro. Microvascular Research. 2003 Jan;65(1):9–17.

233.Fan D, Abhijit Takawale, Basu R, Patel V, Lee J, Vijay Kandalam, et al. Differential role of TIMP2 and TIMP3 in cardiac hypertrophy, fibrosis, and diastolic dysfunction. Cardiovascular Research. 2014 Apr 1;103(2):268–80.

234.Liu Y, Xu Y, Yu Q. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. Oncogene. 2006 Apr 20;25:2452–67.

235.Omura J, Kimio Satoh, Kikuchi N, Taijyu Satoh, Kurosawa R, Masamichi Nogi, et al. ADAMTS8 Promotes the Development of Pulmonary Arterial Hypertension and Right Ventricular Failure. Circulation Research. 2019 Oct 25;125(10):884–906.

236.Plautz WE, Raval JS, Dyer MR, Rollins-Raval MA, Zuckerbraun BS, Neal MD. ADAMTS13: origins, applications, and prospects. Transfusion. 2018 Sep 12;58(10):2453–62.

237.Feng S, Eyler SJ, Zhang Y, Maga T, Nester CM, Kroll MH, et al. Partial ADAMTS13 deficiency in atypical hemolytic uremic syndrome. 2013 Aug 22;122(8):1487–93.

238.Karsenty G, Park RW. Regulation of Type I Collagen Genes Expression. International Reviews of Immunology. 1995 Jan;12(2-4):177–85.

239.Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. The FASEB Journal. 1991 Apr;5(7):2052–60.

240.Vázquez-Villa F, García-Ocaña M, Galván JA, García-Martínez J, García-Pravia C, Primitiva Menéndez-Rodríguez, et al. COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. Tumor Biology. 2015 Mar 12;36(4):2213–22.

241.September A, Posthumus M, van der Merwe L, Schwellnus M, Noakes T, Collins M. The COL12A1 and COL14A1 Genes and Achilles Tendon Injuries. International Journal of Sports Medicine. 2008 Mar;29(3):257–63.

242.Trikka D, Davis T, Lapenta V, Brahe C, Kessling AM. Human COL6A1: Genomic characterization of the globular domains, structural and evolutionary comparison with COL6A2. Mammalian Genome. 1997 May;8(5):342–5.

243.Posthumus M, September AV, O'Cuinneagain D, van der Merwe W, Schwellnus MP, Collins M. The association between the COL12A1 gene and anterior cruciate ligament ruptures. British Journal of Sports Medicine. 2009 May 13;44(16):1160–5.

244.Huebner K, Cannizzaro LA, Jabs EW, S Kivirikko, Manzone H, T Pihlajaniemi, et al. Chromosomal assignment of a gene encoding a new collagen type (COL15A1) to 9q21 → q22. Genomics. 1992 Oct 1;14(2):220–4.

245.Grässel S, Bauer R. COL16A1 (collagen, type XVI, alpha 1). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. 2012 Oct;(9).

246.De Paepe,' A, Nuytinck L, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Naeyaert2 JM. Mutations in the COL5A1 Gene Are Causal in the Ehlers-Danlos Syndromes I and II. Am J Hum Genet. 1997;60:547–54.

247.Pan TC, Zhang R, Sudano D, Marie, Bönnemann CG, Chu ML. New Molecular Mechanism for Ullrich Congenital Muscular Dystrophy: A Heterozygous In-Frame Deletion in the COL6A1 Gene Causes a Severe Phenotype. 2003 Aug 1;73(2):355–69.

248.Christiano AM, Hoffman GG, Chung-Honet LC, Lee S, Cheng W, Uitto J, et al. Structural Organization of the Human Type VII Collagen Gene (COL7A1), Composed of More Exons Than Any Previously Characterized Gene. Genomics. 1994 May;21(1):169–79.

249.Nielsen E, Nielsen K, Ivarsen A, Greenhill NS, Davis PF, Hjortdal J. Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. Cornea. 2016 Jun;35(6):872–7.

250.Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, et al. Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. Genes & Development [Internet]. 1996 Dec 1 [cited 2021 Nov 23];10(23):2981–92. Available from: http://genesdev.cshlp.org/content/10/23/2981.full.pdf

251.Collins M, Posthumus M, Schwellnus MP. The COL1A1 gene and acute soft tissue ruptures. British Journal of Sports Medicine. 2009 Feb 4;44(14):1063–4.

252.Engvall E, Wewer UM. Domains of laminin. Journal of Cellular Biochemistry . 1996 Jun 16;61(4):493–501.

253.Timpl R, Tisi D, Talts JF, Zeynep Andac, Sasaki T, Erhard Hohenester. Structure and function of laminin LG modules. Matrix Biology. 2000 Aug 1;19(4):309–17.

254.Edwards MM, Elmina Mammadova-Bach, Fabien Alpy, Klein A, Hicks WL, Roux M, et al. Mutations in Lama1 Disrupt Retinal Vascular Development and Inner Limiting Membrane Formation. 2010 Mar 1;285(10):7697–711.

255.Sarkozy A, Foley AR, Zambon AA, Bönnemann CG, Muntoni F. LAMA2-Related Dystrophies: Clinical Phenotypes, Disease Biomarkers, and Clinical Trial Readiness. Frontiers in Molecular Neuroscience. 2020 Aug 5;13.

256.Lincoln V, Cogan J, Hou Y, Hirsch M, Hao M, Alexeev V, et al. Gentamicin induces LAMB3 nonsense mutation readthrough and restores functional laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]. 2018 Jul 10;115(28):E6536–45. Available from: https://www.pnas.org/content/115/28/E6536

257.Kleio-Maria Verrou, Panagiota Angeliki Galliou, Papaioannou M, Georgios Koliakos. Phosphorylation mapping of Laminin β1-chain: Kinases in association with active sites. Journal of biosciences/Journal of Biosciences. 2019 May 2;44(2).

258.Benati D, Miselli F, Cocchiarella F, Patrizi C, Carretero M, Baldassarri S, et al. CRISPR/Cas9-Mediated In Situ Correction of LAMB3 Gene in Keratinocytes Derived from a Junctional Epidermolysis Bullosa Patient. Molecular Therapy. 2018 Nov;26(11):2592–603.

259.Gedde-Dahl T, Dupuy BM, Jonassen R, Winberg JO, Anton-Lamprecht I, Olalsen B. Junctional epidermolysis bullosa inversa (locus EBR2A) assigned to 1q31 by linkage and association to LAMC1. Human Molecular Genetics. 1994;3(8):1387–91.

260.Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2003 Jan;4(1):33–45.

261.Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in Cancer. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2002 Jan;39(6):527–79.

262.Zheng YH, Tian C, Meng Y, Qin YW, Du YH, Du J, et al. Osteopontin stimulates autophagy via integrin/CD44 and p38 MAPK signaling pathways in vascular smooth muscle cells. Journal of Cellular Physiology. 2011 Oct 24;227(1):127–35.

263.Ramos TN, Bullard DC, Barnum SR. ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. The Journal of Immunology. 2014 May 2;192(10):4469–74.

264.Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. Journal of Leukocyte Biology. 2020 Mar 17;108(3):787–99.

265.Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, et al. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. Carcinogenesis. 2005 Mar 17;26(5):943–50.

266.Sullivan PF, Keefe RSE, Lange LA, Lange EM, Stroup TS, Lieberman J, et al. NCAM1 and Neurocognition in Schizophrenia. Biological Psychiatry. 2007 Apr;61(7):902–10.

267.Doherty P, Cohen JS, Walsh FC. Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. 1990 Aug 1;5(2):209–19.

268.Brennaman LH, Maness PF. NCAM in Neuropsychiatric and Neurodegenerative Disorders. Advances in experimental medicine and biology. 2009 Nov 23;299–317.

269.Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. The Journal of Clinical Investigation [Internet]. 2001 May 15;107(10):1255–62. Available from: https://www.jci.org/articles/view/11871

270.Cybulsky MI, Jochen W.U. Fries, A. Mark Williams, Sultan P, Eddy RL, Byers MM, et al. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. 1991 Sep 1;88(17):7859–63.

271.Singh V, Kaur R, Kumari P, Pasricha C, Singh R. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry [Internet]. 2023 Aug 1;548:117487. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37442359/

272.Wu S, Hsu LA, Teng MS, Lin JF, Chang HH, Sun YC, et al. Association of SELE genotypes/haplotypes with sE-selectin levels in Taiwanese individuals: interactive effect of MMP9 level. BMC Medical Genetics. 2012 Nov 29;13(1).

273.Rainer TH. L-selectin in health and disease. Resuscitation. 2002 Feb 1;52(2):127–41.

274.Morroll S, Goodchild M, Salmon N, Copeland N, Gilbert D, Jenkins N, et al. The genes encoding E-selectin (SELE) and lymphotactin (SCYC1) lie on separate chicken chromosomes although they are closely linked in human and mouse. Immunogenetics. 2001 Aug 1;53(6):477–82.

275.Rosen SD. Ligands for L-Selectin: Homing, Inflammation, and Beyond. Annual Review of Immunology. 2004 Apr;22(1):129–56.

276.Benkerrou M, Delarche C, Brahimi L, FayM, Vilmer E, Elion J, et al. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H2O2 production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. Blood. 2002 Apr 1;99(7):2297–303.

277.Obeagu E. Exploring the Role of L-selectin in HIV-related Immune Exhaustion: Insights and Therapeutic Implications.

278.Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Inflammatory roles of P-selectin. Journal of Clinical Investigation [Internet]. 1993 Aug 1 [cited 2019 Nov 20];92(2):559–70. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC294887/pdf/jcinvest00029-0033.pdf

279.Harrison-Lavoie KJ, Michaux G, Hewlett L, Kaur J, Hannah MJ, Lui-Roberts WWY, et al. P-Selectin and CD63 Use Different Mechanisms for Delivery to Weibel-Palade Bodies. Traffic. 2006 Apr 10;7(6):647–62.

280André P. P-selectin in haemostasis. British Journal of Haematology. 2004 Jun 4;126(3):298–306.

281.Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. Human Mutation. 1998;12(4):226–37.

282.Gall TMH, Frampton AE. Gene of the month: E-cadherin (CDH1). Journal of Clinical Pathology. 2013 Aug 12;66(11):928–32.

283.Tang B, Tang F, Wang Z, Qi G, Liang X, Li B, et al. Overexpression of CTNND1 in hepatocellular carcinoma promotes carcinous characters through activation of Wnt/β-catenin signaling. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2016 May 18;35(1).

284.Huang X, Huang X, Li J, Li J. Expression of Catenin Delta 1 (CTNND1) in Pan-creatic Cancer and Its Influence on Tumor Cell Biologi-cal Behavior. Ann Clin Med Case Rep. 2023;10(22):1–9.

285.Liu TX, Becker MW, Jelinek J, Wu WS, Deng M, Mikhalkevich N, et al. Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding α-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. Nature Medicine. 2006 Dec 10;13(1):78–83.

286.Gao C, Wang Y, Broaddus R, Sun L, Xue F, Zhang W. Exon 3 mutations of *CTNNB1* drive tumorigenesis: a review. Oncotarget [Internet]. 2017 Dec 27;9(4). Available from: http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=23695&path[]=74588

287.Qun Lü, Aguilar BJ, Li M, Jiang Y, Chen Y. Genetic alterations of δ-catenin/NPRAP/Neurojungin (CTNND2): functional implications in complex human diseases. Human Genetics. 2016 Jul 5;135(10):1107–16.

288.Hofmeister W, Nilsson D, Topa A, Britt-Marie Anderlid, Fahimeh Darki, Matsson H, et al. *CTNND2*—a candidate gene for reading problems and mild intellectual disability. 2014 Dec 3;52(2):111–22.

289.Isenberg JS, Roberts DD. THBS1 (thrombospondin-1). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. 2020 Apr;(8).

290.Wen Z, Zhang Y, Wang X, Wu Y, Mao J, Li Q, et al. THBS1-Mediated Degradation of Collagen via the PI3K/AKT Pathway Facilitates the Metastasis and Poor Prognosis of OSCC. International Journal of Molecular Sciences. 2023 Aug 28;24(17):13312–2.

291.Pal SK, Nguyen CTK, Morita KI, Miki Y, Kayamori K, Yamaguchi A, et al. THBS1 is induced by TGFB1 in the cancer stroma and promotes invasion of oral squamous cell carcinoma. Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2021 Apr 29];45(10):730–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26850833/

292.Wang X, Zhang L, Li H, Sun W, Zhang H, Lai M. THBS2 is a Potential Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. Scientific Reports. 2016 Sep 16;6(1).

293.Qu H, Hasen G, Hou Y, Zhang CC. THBS2 promotes cell migration and invasion in colorectal cancer via modulating Wnt/β-catenin signaling pathway. 2022 Mar 22;38(5):469–78.

294.Yan J, Zhao Y, Zhu X, Lu H, Wang Y, Wang S, et al. The mechanism study of THBS3 in regulating cartilage vascularization/bone coupling via the TGF-β/Smad2/3 pathway in osteoarthritis. Research Square (Research Square). 2024 Apr 5;

295.Vos HL, Devarayalu S, de Vries Y, Bornstein P. Thrombospondin 3 (Thbs3), a new member of the thrombospondin gene family. Journal of Biological Chemistry. 1992 Jun;267(17):12192–6.

296.Lu Y, Kong X, Zhong W, Hu M, Li C. Diagnostic, Therapeutic, and Prognostic Value of the Thrombospondin Family in Gastric Cancer. Frontiers in Molecular Biosciences. 2021 Apr 28;8.

297.Ma F, Li W, Liu C, Li W, Yu H, Lei B, et al. MiR-23a promotes TGF-β1-induced EMT and tumor metastasis in breast cancer cells by directly targeting CDH1 and activating Wnt/β-catenin signaling. Oncotarget. 2017 Jun 9;8(41):69538–50.

298.Calve S, Isaac J, Gumucio JP, Mendias CL. Hyaluronic acid, HAS1, and HAS2 are significantly upregulated during muscle hypertrophy. American Journal of Physiology-Cell Physiology [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2019 Dec 9];303(5):C577–88. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3468343/

299.Calabro A, Oken MM, Hascall VC, Masellis AM. Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells:

predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients. Blood. 2002 Oct 1;100(7):2578–85.

300.Ferrero E, Ferrero ME, Pardi R, Zocchi MR. The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. FEBS Letters. 1995 Nov 6;374(3):323–6.

301.Villar J, Zhang H, Slutsky AS. Lung Repair and Regeneration in ARDS. Chest. 2019 Mar;155(3):587–94.

302.Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2007 Dec;27(12):2514–23.

303.Carecchio M, Magliozzi M, Copetti M, Ferraris A, Bernardini L, Bonetti M, et al. Defining the Epsilon-Sarcoglycan (SGCE) Gene Phenotypic Signature in Myoclonus-Dystonia: A Reappraisal of Genetic Testing Criteria. Movement Disorders. 2013 May 15;28(6):787–94.

304.Grabowski M, Zimprich A, Lorenz-Depiereux B, Kalscheuer VM, Asmus F, Gasser T, et al. The epsilon-sarcoglycan gene (SGCE), mutated in myoclonus-dystonia syndrome, is maternally imprinted. European Journal of Human Genetics. 2003 Feb 1;11(2):138–44.

305.Grundmann K, Laubis-Herrmann U, Dressler D, Vollmer-Haase J, Bauer P, Stuhrmann M, et al. Lack of mutations in the epsilon-sarcoglycan gene in patients with different subtypes of primary dystonias. Movement Disorders. 2004 May 26;19(11):1294–7.

306.Elleuch N, Depienne C, Benomar A, Hernandez AMO, Ferrer X, Fontaine B, et al. Mutation analysis of the paraplegin gene (SPG7) in patients with hereditary spastic paraplegia. Neurology [Internet]. 2006 Mar 14 [cited 2023 Nov 9];66(5):654–9. Available from: https://n.neurology.org/content/66/5/654.short

307.Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. Acta Neuropathologica. 2013 Jul 30;126(3):307–28.

308.Kanda M, Shimizu D, Fujii T, Sueoka S, Tanaka Y, Kazuhiro Ezaka, et al. Function and diagnostic value of Anosmin-1 in gastric cancer progression. International Journal of Cancer. 2015 Sep 1;138(3):721–30.

309.de Castro F, Seal R, Maggi R. ANOS1: a unified nomenclature for Kallmann syndrome 1 gene (KAL1) and anosmin-1. Briefings in Functional Genomics. 2016 Nov 13;16(4):205–10.

310.Hardelin JP. Kallmann syndrome: towards molecular pathogenesis. Molecular and Cellular Endocrinology. 2001 Jun;179(1-2):75–81.

311.Hall-Glenn F, Lyons KM. Roles for CCN2 in normal physiological processes. Cellular and Molecular Life Sciences. 2011 Aug 20;68(19):3209–17.

312.Kubota S, Takigawa M. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. Clinical Science. 2015 Feb 1;128(3):181–96.

313.Xie XW, Jiang SS, Li X. CLEC3B as a Potential Prognostic Biomarker in Hepatocellular Carcinoma. Frontiers in Molecular Biosciences. 2021 Jan 20;7.

314.Anderson C, Gerding WM, Christoph Fraenz, Schlüter C, Friedrich P, Maximilian Raane, et al. PLP1 and CNTN1 gene variation modulates the microstructure of human white matter in the corpus callosum. Brain Structure and Function. 2018 Aug 9;223(8):3875–87.

315.Baron M, Norman D, Willis A, Campbell ID. Structure of the fibronectin type 1 module. Nature [Internet]. 1990 Jun 1 [cited 2022 Oct 20];345(6276):642–6. Available from: https://www.nature.com/articles/345642a0

316.Yan Q, Sage EH. SPARC, a Matricellular Glycoprotein with Important Biological Functions. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 1999 Dec;47(12):1495–505.

317.Sercu S, Oyama N, Merregaert J. Importance of Extracellular Matrix Protein 1 (ECM1) in Maintaining the Functional Integrity of the Human Skin. The Open Dermatology Journal. 2009 Apr 2;3(1):44–51.

318.Elliot Yi-Hsin Lin, Xi W, Aggarwal N, Shinohara ML. Osteopontin (OPN)/SPP1: from its biochemistry to biological functions in the innate immune system and the central nervous system (CNS). International Immunology. 2022 Dec 16;35(4):171–80.

319.Streuli CH, Schmidhauser C, Kobrin M, Bissell MJ, Derynck R. Extracellular matrix regulates expression of the TGF-beta 1 gene. The Journal of Cell Biology. 1993 Jan 1;120(1):253–60.

320.Jones PL, Jones FS. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. Matrix Biology. 2000 Dec;19(7):581–96.

321.Li W, Han F, Fu M, Wang Z. High expression of VCAN is an independent predictor of poor prognosis in gastric cancer. Journal of International Medical Research. 2020 Jan;48(1):030006051989127.

322.Seiffert D, Crain K, Wagner NV, Loskutoff DJ. Vitronectin gene expression in vivo. Evidence for extrahepatic synthesis and acute phase regulation. Journal of Biological Chemistry. 1994 Aug 1;269(31):19836–42.

323.Avinash K, Malaippan S, Dooraiswamy JN. Methods of Isolation and Characterization of Stem Cells from Different Regions of Oral Cavity Using Markers: A Systematic Review. International Journal of Stem Cells. 2017 May 30;10(1):12–20.

324.Costela-Ruiz VJ, Melguizo-Rodríguez L, Bellotti C, Illescas-Montes R, Stanco D, Arciola CR, et al. Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Oct 16];23(11):6356. Available from: https://www.mdpi.com/1422-0067/23/11/6356

325.Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 2004 Jan;15(1):13–27.

326.Peneva M, Mitev V, Ishkitiev N. ISOLATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE PULP OF DECIDUOUS TEETH. Journal of IMAB-Annual Proceeding (Scientific Papers). 2008 Jan 1;2:84–7.

327.Hristov K, Gateva N, Stanimirov P, Ishkitiev N, Tsikandelova R. INFLUENCE OF STORAGE MEDIA ON THE VITALITY OF STEM CELLS FROM APICAL PAPILLA. Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers). 2018 Mar 1;24(1):1914–7.

328.Tizu M, Ion Mărunțelu, Cristea B, Nistor C, Nikolay Ishkitiev, Zornitsa Mihaylova, et al. PLGA Nanoparticles Uptake in Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth and Oral Keratinocyte Stem Cells. Journal of Functional Biomaterials. 2022 Jul 31;13(3):109–9.

329.Jeon BG, Kang EJ, Kumar BM, Maeng GH, Ock SA, Kwack DO, et al. Comparative Analysis of Telomere Length, Telomerase and Reverse Transcriptase Activity in Human Dental Stem Cells. Cell Transplantation. 2011 Dec;20(11-12):1693–705.

330.Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, et al. Multipotential Nestin-Positive Stem Cells Isolated From Adult Pancreatic Islets Differentiate Ex Vivo Into Pancreatic Endocrine, Exocrine, and Hepatic Phenotypes. Diabetes. 2001 Mar 1;50(3):521–33.

331.Heng BC, Zhu S, Xu J, Yuan C, Gong T, Zhang C. Effects of decellularized matrices derived from periodontal ligament stem cells and SHED on the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. Tissue and Cell. 2016 Apr;48(2):133–43.

332.Yang H, Gao LN, An Y, Hu CH, Jin F, Zhou J, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. Biomaterials. 2013 Sep;34(29):7033–47.

333.Qu G, Li Y, Chen L, Chen Q, Zou D, Yang C, et al. Comparison of Osteogenic Differentiation Potential of Human Dental-Derived Stem Cells Isolated from Dental Pulp, Periodontal Ligament, Dental Follicle, and Alveolar Bone. Wang A, editor. Stem Cells International. 2021 Apr 7;2021:1–12.

334.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.

335.Rozaliya Tsikandelova, Petko Mladenov, Planchon S, Kalenderova S, Praskova M, Z. Mihaylova, et al. Proteome Response of Dental Pulp Cells to Exogenous FGF8. Journal of Proteomics. 2018 Jul 1;183:14–24.

336.Fawzy El-Sayed KM, Dörfer CE. Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. Stem Cells International. 2016;2016(-):1–16.

337.Pablo Y de, Marasek P, Pozo-Rodrigálvarez A, Wilhelmsson U, Inagaki M, Pekna M, et al. Vimentin Phosphorylation Is Required for Normal Cell Division of Immature Astrocytes. Cells. 2019 Sep 1;8(9):1016.

338.Kreis S, Hans-Joachim Schönfeld, Melchior C, Steiner B, Kieffer N. The Intermediate Filament Protein Vimentin Binds Specifically to a Recombinant Integrin ?2/?1 Cytoplasmic Tail Complex and co-localizes with Native ?2/?1 in Endothelial Cell Focal Adhesions. Experimental Cell Research. 2005 Apr 15;305(1):110–21.

339.Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 Is the Principal Cell Surface Receptor for Hyaluronate. Cell. 1990 Jun;61(7):1303–13.

340.Wu K, Xu H, Tian Y, Yuan X, Wu H, Liu Q, et al. The role of CD44 in epithelial–mesenchymal transition and cancer development. OncoTargets and Therapy. 2015 Dec;3783.

341.Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. Gene [Internet]. 2020 Jun 6;754:144855. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32522695/

342.Köllmer M, Buhrman JS, Zhang Y, Gemeinhart RA. Markers are shared between adipogenic and osteogenic differentiated mesenchymal stem cells. Journal of Developmental Biology and Tissue Engineering. 2013 May;5(2):18–25.

343.Singh D, Rai V, K Agrawal D. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. Cardiology and Cardiovascular Medicine. 2023;07(01).

344.Bigoni-Ordóñez GD, Czarnowski D, Parsons T, Madlambayan GJ, Villa-Diaz LG. Integrin α6 (CD49f), The Microenvironment and Cancer Stem Cells. Current Stem Cell Research & Therapy. 2019 Jul 4;14(5):428–36.

345.Harkness L, Zaher W, Ditzel N, Isa A, Kassem M. CD146/MCAM defines functionality of human bone marrow stromal stem cell populations. 2016 Jan 11;7(1).

346.Álvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y, Otero-Hernández J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. World Journal of Stem Cells [Internet]. 2015 Mar 26;7(2):470–6. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4369502/

347.Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): A Review on Expression in Normal and Neoplastic Tissues, and Mutations and Their Clinicopathologic Correlation. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. 2005 Sep;13(3):205–20.

348.Jo A, Denduluri S, Zhang B, Wang Z, Yin L, Yan Z, et al. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. Genes & Diseases. 2014 Dec;1(2):149–61.

349.Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. The Journal of Biological Chemistry [Internet]. 2005 Feb 18;280(7):5307–17. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15557334/#:~:text=Oct%2D3%2F4%20is%20a

350.Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. Journal of Cell Science. 1992 Oct 1;103(2):589–97.

351.ZHANG YD, CHEN Z, SONG YQ, LIU C, CHEN YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. Cell Research. 2005 May 1;15(5):301–16.

352.Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, et al. Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. Day R, editor. Journal of Tissue Engineering [Internet]. 2010 Jan;1(1):218142. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3042641/

353.Alvarez R, Lee HL, Wang CY, Hong C. Characterization of the Osteogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells from Human Periodontal Ligament Based on Cell Surface Markers. International Journal of Oral Science. 2015 Oct 30;7(4):213–9.

354.Ying M, Liu G, Shimada H, Ding W, May W, He Q, et al. Human osteosarcoma CD49f−CD133+ cells: impaired in osteogenic fate while gain of tumorigenicity. Oncogene. 2012 Oct 8;32(36):4252–63.

355.Rizk A, Rabie ABM. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β3 transgene for cartilage-like tissue engineering. Cytotherapy. 2013 Jun;15(6):712–25.

356.Baek KH, Choi J, Pei CZ. Cellular Functions of OCT-3/4 Regulated by Ubiquitination in Proliferating Cells. Cancers. 2020 Mar 12;12(3):663.

357.Huang T, Wang L, Liu D, Li P, Xiong H, Zhuang L, et al. FGF7/FGFR2 Signal Promotes Invasion and Migration in Human Gastric Cancer through Upregulation of thrombospondin-1. International Journal of Oncology [Internet]. 2017 Mar 22 [cited 2022 Nov 18];50(5):1501–12. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5403236/

358.Yao J, Chen N, Wang X, Zhang L, Huo J, Chi Y, et al. Human Supernumerary Teeth-Derived Apical Papillary Stem Cells Possess Preferable Characteristics and Efficacy on Hepatic Fibrosis in Mice. Stem Cells International. 2020 Jan 30;2020:1–12.

359.Clause KC, Barker TH. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. Current Opinion in Biotechnology. 2013 Oct;24(5):830–3.

360.Yao Y. Laminin: loss-of-function studies. Cellular and Molecular Life Sciences. 2016 Oct 1;74(6):1095–115.

361. Zhu Y, Zhang X, Gu R, Liu X, Wang S, Xia D, et al. LAMA2 regulates the fate commitment of mesenchymal stem cells via hedgehog signaling. Stem Cell Research & Therapy. 2020 Mar 25;11(1).

362. Lee H, Kim WJ, Kang HG, Jang JH, Choi IJ, Chun KH, et al. Upregulation of LAMB1 via ERK/c-Jun Axis Promotes Gastric Cancer Growth and Motility. International Journal of Molecular Sciences. 2021 Jan 10;22(2):626.

363. Wan Q, Liu F, Zhang J, Chen H, Yan L, Li X, et al. Overexpression of laminin α4 facilitates proliferation and migration of fibroblasts in knee arthrofibrosis by targeting canonical Shh/Gli1 signaling. Connective Tissue Research. 2020 Jun 10;1–11.

364. Keane TJ, Horejs CM, Stevens MM. Scarring vs. Functional healing: Matrix-based Strategies to Regulate Tissue Repair. Advanced Drug Delivery Reviews. 2018 Apr;129:407–19.

365. Benoit YD, Lussier C, Ducharme PA, Sivret S, Schnapp LM, Basora N, Beaulieu JF. Integrin α8β1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. Biology of the Cell. 2009 Dec;101(12):695-708.

366. Hartner A, Schöcklmann H, Pröls F, Müller U, Sterzel RB. α8 integrin in glomerular mesangial cells and in experimental glomerulonephritis. Kidney international. 1999 Oct 1;56(4):1468-80.

367. Levine D, Rockey DC, Milner TA, Breuss JM, Fallon JT, Schnapp LM. Expression of the integrin α8β1 during pulmonary and hepatic fibrosis. The American journal of pathology. 2000 Jun 1;156(6):1927-35.

368.Schnapp LM, Breuss JM, Ramos DM, Sheppard D, Pytela R. Sequence and tissue distribution of the human integrin α8 subunit: a β1-associated α subunit expressed in smooth muscle cells. Journal of Cell Science. 1995 Feb 1;108(2):537-44.

369. Bouzeghrane F, Reinhardt DP, Reudelhuber TL, Thibault G. Enhanced expression of fibrillin-1, a constituent of the myocardial extracellular matrix in fibrosis. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2005 Sep;289(3):H982-91.

370. Brandenberger R, Schmidt A, Linton J, Wang D, Backus C, Denda S, Müller U, Reichardt LF. Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin α8β1 in the embryonic kidney. The Journal of cell biology. 2001 Jul 7;154(2):447.

371. Denda S, Reichardt LF, Muller U. Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin α8β1 and potential roles for this integrin–ligand interaction in kidney morphogenesis. Molecular biology of the cell. 1998 Jun 1;9(6):1425-35.

372. Schnapp LM, Hatch N, Ramos DM, Klimanskaya IV, Sheppard D, Pytela R. The Human Integrin α8β1 Functions as a Receptor for Tenascin, Fibronectin, and Vitronectin (∗). Journal of Biological Chemistry. 1995 Sep 29;270(39):23196-202.

373. Asano Y, Hironobu Ihn, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Increased Expression Levels of Integrin αvβ5 on Scleroderma Fibroblasts. American Journal Of Pathology. 2004 Apr 1;164(4):1275–92.

374. Suarez E, Syed F, Alonso-Rasgado T, Mandal P, Bayat A. Up-regulation of tension-related proteins in keloids: knockdown of Hsp27, α2β1-integrin, and PAI-2 shows convincing

reduction of extracellular matrix production. Plastic and reconstructive surgery. 2013 Feb 1;131(2):158e-73e.

375. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2016 Mar 30;31(sup1):177–83.

376. Abdullah MF, Abdullah SF, Omar NS, Mahmood Z, Fazliah Mohd Noor SN, Kannan TP, et al. Proliferation Rate of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp and Identification of Differentially Expressed Genes. Cell Biology International. 2014 Jan 13;38(5):582–90.

377. Mao X, Chen Z, Ling J, Quan J, Peng H, Xiao Y. Methoxy-Poly(ethylene glycol) Modified Poly(L-lactide) Enhanced Cell Affinity of Human Bone Marrow Stromal Cells by the Upregulation of 1-Cadherin and Delta-2-catenin. BioMed Research International. 2014 Jan 1;2014:1–9.

378. Gan L, Liu Y, Cui D, Pan Y, Zheng L, Wan M. Dental Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Therapeutic Application. Stem Cells International. 2020 Sep 1;2020:1–17.

379. Hu L, Zhao B, Gao Z, Xu J, Fan Z, Zhang C, et al. Regeneration characteristics of different dental derived stem cell sheets. Journal of Oral Rehabilitation. 2019 Jul 17;47(S1):66–72.

380. Yokoyama T, Yagi Mendoza H, Tanaka T, Ii H, Takano R, Yaegaki K, et al. Regulation of CCl4-induced Liver Cirrhosis by Hepatically Differentiated Human Dental Pulp Stem Cells. Human Cell. 2019 Jan 12;32(2):125–40.

381. Clarke D, Frisén J. Differentiation Potential of Adult Stem Cells. Current Opinion in Genetics & Development. 2001 Oct;11(5):575–80.

11.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;

12. 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]