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

Д-р Зорница Господинова Михайлова

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

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност: Орална и лицево-челюстна хирургия

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

СОФИЯ
2017г.

Дисертационният труд съдържа 204 страници и е онагледен с 10 таблици и 25 фигури. Библиографията включва 323 литературни източника, от които 6 на кирилица и 317 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 18.12.2017г. от 13:30 часа в Първа аудитория на ФДМ – София, ул. „Георги Софийски“ №1, съгласно чл. 76 и чл. 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ – София и Заповед №РК36-2302/11.10.2017г. на Ректора на МУ – София, на открито заседание на научно жури в състав:

Председател:
Акад. Проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн-вътрешен член и научен ръководител
Членове:
Доц. д-р Павел Кирилов Станимиров,дм-вътрешен член, рецензент и научен ръководител
Чл. Кор. Проф. д-р Румен Георгиев Панков, дбн-външен член и рецензент
Проф. д-р Петър Георгиев Кавлаков, дмн-външен член
Доц. д-р Петя Филипова Печалова, дм-външен член

Резервни членове:
Доц. д-р Елица Георгиева Деливерска-Александрова, дм-вътрешен член
Доц. д-р Боян Стоянов Владимиров, дм-външен член

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ФДМ – София и са публикувани на интернет страницата на МУ – София

Забележка: В автореферата номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ…….……5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ…….....7
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ…….....…8
IV. РЕЗУЛТАТИ…….....29
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ…….....40
VI. ИЗВОДИ…….....43
VII. ПРИНОСИ…….....44
VIII. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД…….....45

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

ЕДТА – етилен диамин тетраацетат

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс

МСК – мезенхимни стволови клетки

МСКПДЛ – мезенхимни стволови клетки от периодонтален лигамент

ПДЛ – периодонтален лигамент

РФ – растежен фактор

ФТС – фетален телешки серум

СКПДЛ – стволови клетки от периодонтален лигамент

ТРФ – тромбоцитен растежен фактор

ALP – алкална фосфатаза, alkaline phosphatase

BSA – телешки серумен албумин, bovine serum albumin

BSP – костен сиалопротеин, bone sialoprotein

CD – клъстър по предназначение, cluster of designation/differentiation

COL1A2 – колаген тип 1a2, collagen type 1a2

COL3A1 – колаген тип 3a1, collagen type 3a1

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

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

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

LOX – лизил оксидаза, lysyl oxidase

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

PBS – фосфатен буферен разтвор, phosphate buffered saline

PDGF – тромбоцитен растежен фактор, platelet derived growth factor

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

TRIS-HCL – трис-хидрохлорид, tris-hydrochloride

I.ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

МСК в ПДЛ са клетки, свързани с поддържането на интегритета, функцията и най-вече на регенеративните процеси в периодонциума. МСК от ПДЛ притежават всички характерни особености на стволовите клетки от мезенхимен произход. Могат да се диференцират до различни типове клетки (мезенхимни и немезенхимни) в зависимост от условията на култивиране. Обикновено, изолирането на периодонтални МСК става след рутинна екстракция на интактни трети молари или на премолари по ортодонтски показания. До момента е известно, че се провеждат предимно *in vitro* и предклинични експерименти с периодонтални стволови клетки. Липсват данни от клинични експерименти с високо ниво на достоверност (Ниво на достоверност А и В). Провеждането на такива клинични експерименти може да се реализира след предварително изпълнение на добре планирани и достатъчно убедителни *in vitro* опити.

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

именно с участието на ТК и активните молекули в тях. В практиката започват да навлизат и разработени рекомбинантни форми на РФ.

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

Характеризирането на стволовите клетки от зъбен произход и детайлното изследване на ефектите, които РФ оказват върху тях, ще доведе до разработването на нови терапевтични методики за лечение на хирургичните заболявания в лицево-челюстната област. Преди да стане възможно рутинното им използване в клиниката, трябва да бъдат проведени редица *in vitro* експерименти, които да предоставят информация за точните им механизми на действие.

II.ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

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

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

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

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

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

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

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

III.МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛИ

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

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

Критерии за подбор на пациентите и зъбите:

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

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

В изследването са използвани следните материали за *in vitro* клетъчно култивиране: хранителна среда на Ийгъл, модифицирана от Дълбеко – Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12) high glucose (AppliChem GmbH, Darmstadt,

Germany); ФТС (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); инсулин-трасферин-селен (insulin-trasferin-selenium - ITS) (Gibco Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA); антибиотици в комбинация с антимикотик – пеницилин/стрептомицин/амфотерицин (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); ензими за лизиране на тъканните експлантати и получаване на суспензия от единични клетки колагеназа тип I (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) и диспаза (LifeScan, Inc., Milpitas, CA, USA); фосфатен буферен разтвор – Phosphate-buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium); 0,05% трипсин/ЕДТА (етилен-диамин-тетра-ацетат) (Lonza, Verviers, Belgium) за отделяне на адхезирали клетки от дъното на културелни съдове; 2% BSA (bovine serum albumine)-телешки серумен албумин (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); Bradford Reagent (Sigma-Aldrich) за определане количеството общ белтък в пробите; багрило за оцветяване на калциеви нодули Alizarin Red S (AppliChem).

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

- Стволовоклетъчни: Анти-CD44 (Santa Cruz, Santa Cruz, USA); Анти-CD105/ендоглин (Santa Cruz); Анти-CD117 (Santa Cruz); Анти-STRO-1 (Santa Cruz); Анти-CD49f (интегрин алфа-6) моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA); Анти-CD146 моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, САЩ); Анти-CD271 моноклонално антитяло директно конюгирано с флуорохром (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); Анти-CD4 (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland)
- Диференциационни: Анти-ALP IgG (Santa Cruz); Анти-COL1a2 IgG (Santa Cruz); Анти-COL3a1 IgG (Santa Cruz); Анти-SPARC IgG (Santa Cruz); Анти-BSP II (Santa Cruz)
- Вторични флуоресцентни антитела: Козе анти-мише антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 488 IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Магарешко анти-заешко антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 568 IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

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

- Cytell™ Cell Cycle Kit (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)

- Sircol Collagen Assay Kit (Biocolor Ltd, Carrickfergus, United Kingdom)
- Lysyl Oxidase Activity Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK)
- Alkaline Phosphatase Assay Kit (Fluorometric) (Abnova, Taipei, Taiwan)

МЕТОДИКИ

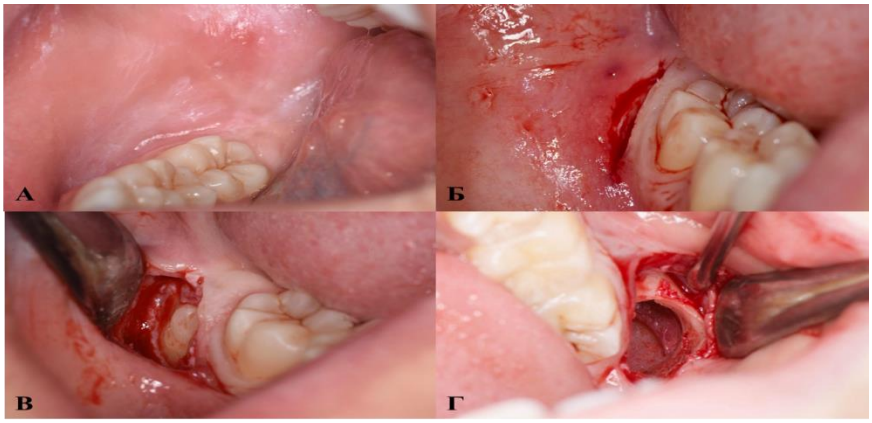
1.Екстракция на трети молари, изолиране, *in vitro* култивиране и характеризиране на клетките.

1.1.Екстракция на трети молари и изолиране на първична клетъчна култура от периодонтален лигамент.

Екстракция на зъбите:

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

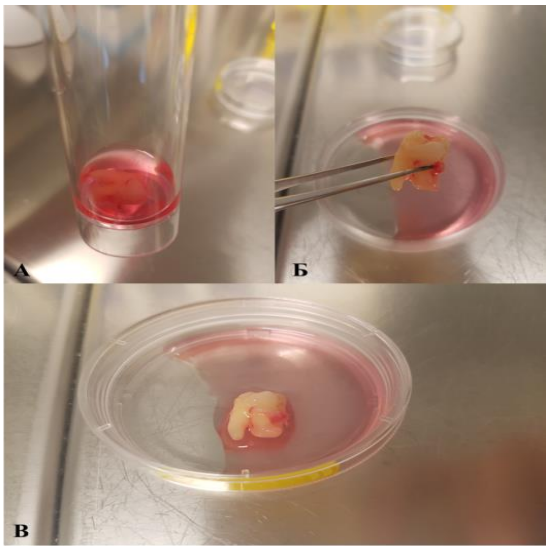
За ретенираните и полуретенираните зъби се провежда хирургична екстракция-extractio per trepanationem/odontectomia – с оформяне на муко-периостално ламбо с вестибуларен достъп (*Фиг. 1 А,Б,В,Г*). Костта, покриваща частично или напълно зъба се премахва с костна фреза. Зъбът се екстрахира със запазена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



Фиг. 1 Етапи на екстракция на долен трети молар

Зъбите се промиват обилно със стерилен физиологичен разтвор непосредствено след екстракцията. Екстрахираните зъби се съхраняват в стерилни пластмасови

контейнери (DELTALAB SL, Pl. La Verneda, Spain) с 3-4 ml хранителна среда с високо съдържание на глюкоза: Хранителна среда на Ийгъл, модифицирана от Дълбеко – Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12) high glucose (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) с добавени 100 U/ml пеницилин, 100 µg/ml стрептомицин, 0,25 µg/ml амфотерицин (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). В рамките на 24ч., зъбите се транспортират до лабораторията. Там се промиват трикратно с фосфатен буферен разтвор – Phosphate-buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium) (*Фиг. 2*). ПДЛ се събира от средната трета на кореновата повърхност на зъбите чрез внимателно остъргване. За целта се използват стерилни лезвиета №10 и 15 (Heinz Herenz, Hamburg, Germany). Събраният материал се поставя в 0,5-1ml разтвор на 3mg/ml колагеназа тип I (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) и 4mg/ml диспаза (LifeScan, Inc., Milpitas, CA, USA) за 1ч. на температура 37°C, 5% CO_2 и 50% влажност в инкубатор. Суспензията се центрофугира за 4 мин. при 3000 оборота/мин. Получената на повърхността течна фракция, наречена супернатанта, се отстранява. Утаените клетки се ресуспендират в 1ml хранителна среда и се пропускат през стерилно сито с размер на порите 70µm (BD Falcon, Heidelberg, Germany). Целта е получаването на суспензия от отделни клетки, които самостоятелно да адхезират към дъното на съда, в който се засяват. Клетките се засяват в пластмасови петриеви панички с диаметър 2cm (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) със среда и добавени към нея антибиотик и 20% ФТС (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).



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

1.2.*In vitro* клетъчно култивиране

Клетките се култивират при температура 37°C, 5% CO_2 и 50% влажност в инкубатор. През дните след засяване на клетките се следи тяхната миграция от тъканния

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

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

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

1.3.Характеризиране: изследване експресията на маркери при периодонтални стволови клетки

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

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

Флоуцитометричен анализ

Флоуцитометрията е метод, който позволява изследване и анализ на редица клетъчни характеристики. За целта клетките трябва да бъдат в суспензия и да бъдат белязани с флуоресцентни антитела. Антителата обикновено се свързват към специфични протеини по повърхността на клетката или вътре в нея. Клетъчната суспензия се пропуска през фокусиран лазерен лъч. Методът дава информация, свързана с клетъчния размер, състоянието на ДНК и РНК, състав на цитоплазмата, екпресия на повърхностни и вътрешноклетъчни маркери и протеини. Отчитането на резултатите се прави на базата на интензитета от разсеяната и излъчената от частиците (в случая клетките) светлина.

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

В експеримента се използват:

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

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

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

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

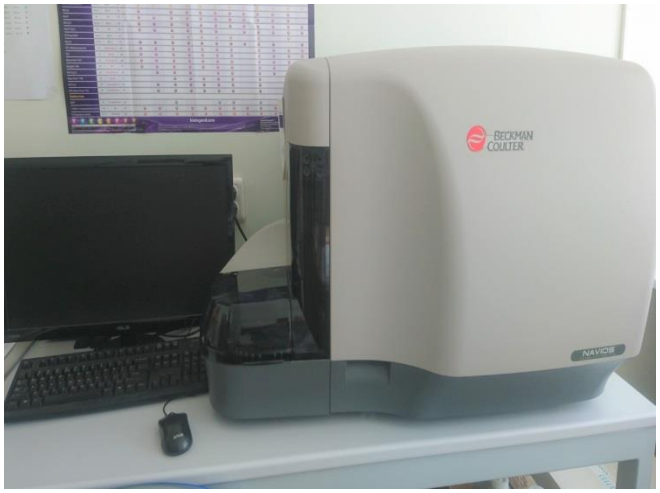
Антителата CD44, CD105, CD117, STRO-1, използвани в експериментите не са директно свързани с флуорохром. Това налага използването на вторични флуоресцентни антитела, които се свърват с първичните и така да се установи експресията. В настоящото изследване се използват следните вторични флуоресцентни антитела:

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

Прилага се следният протокол:

- Клетките в културелния съд се измиват с PBS за 5мин.
- Инкубиране с 2ml 0,05% трипсин/ЕДТА в рамките на 10мин., за да бъдат отлепени клетките от дъното на съда за клетъчно култивиране
- Разпределяне на клетките по равен брой в 15-ml пластмасови епруветки
- Инкубиране с 2% BSA в PBS, за да бъдат блокирани неспецифичните места за свързване на антителата
- Измиване на клетките с PBS за 5мин.
- Инкубиране на клетките за 30мин. на стайна температура (19^{o}-25^{o}C) с първично антитяло небелязано с флуорохром, разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:250
- Антитела CD49f и CD271, директно конюгирани с флуорохром, се добавят разредени в 2% BSA-PBS в съотношение 1:1000; инкубират се също за 30 мин. на стайна температура, далече от пряка светлина
- Измиване на клетките, белязани с моноклонални антитела (неконюгирани с флуорохром) с PBS за 5мин.
- Маркиране на първичните моноклонални антитела, неконюгирани с флуорохром чрез инкубиране с вторични, конюгирани с флуоресцентен маркер за 20 мин. на тъмно
- След всяко измиване, клетките се центрофугират за 4 мин. на 3000 оборота/мин.

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



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

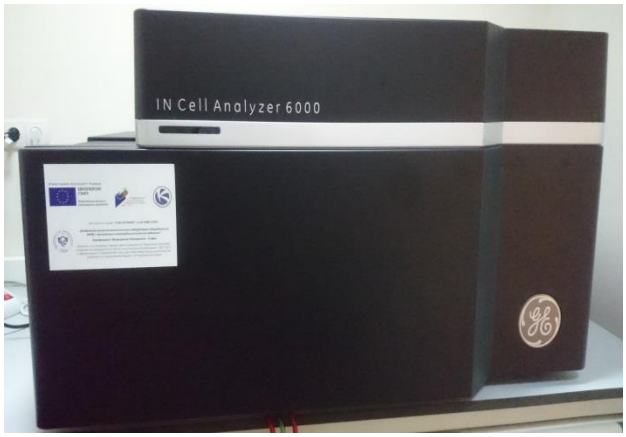
Имунофлуоресценция

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

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

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

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



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

Изследване експресията на <u>повърхностни маркери</u>

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

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

В експеримента се използват:

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

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

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

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

  Анти-CD117 моноклонално антитяло (Santa Cruz)

  Анти-STRO-1 моноклонално антитяло (Santa Cruz)
- Като втори антитела се използват:

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

Магарешко анти-заешко антитяло, конюгирано с AlexaFluor® 568 IgG (Invitrogen)

- Нуклеинови бои (за визуализиране на клетъчните ядра): 4',6-диамидино-2-фенил-индол, дихидрохлорид (DAPI) и SYBR®Green (Invitrogen).

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

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

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

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

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

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

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

Изследване експресията на <u>вътрешноклетъчни маркери</u>

Изследват се следните антитела:

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

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

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

В експеримента се използват:

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

  Анти-ALP IgG (Santa Cruz)

  Анти-COL1a2 IgG (Santa Cruz)

  Анти-COL3a1 IgG (Santa Cruz)

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

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

Протокол за непряка имунофлуоресценция:

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

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

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

2.Изследване влиянието на PDGF-BB върху клетъчния цикъл и пролиферация

2.1.Изследване ефекта на PDGF-BB върху клетъчния цикъл

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

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

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

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

Използваният протокол е по препоръки на производителя на използвания кит:

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

2.2.Изследване ефекта на PDGF-BB върху клетъчната пролиферация

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

За изследване на пролиферацията клетки с гъстота 5 x 10^3 клетки/cm^2 от 2-ри до 4-ти пасаж се засяват в 96-ямкова плака в среда DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС. След 24ч. средата се сменя с DMEM с добавени антибиотик и 1% ITS (като заместител на серума). Добавя се и PDGF-BB в следните концентрации: 1ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml. За контрола се използват клетки, култивирани в среда, съдържаща само 1% ITS без PDGF-BB. Целта е да се изследва самостоятелното влияние на PDGF-BB върху клетъчната пролиферация и да се елиминира всеки минимален ефект на другите активни молекули във ФТС. Клетъчните култури се инкубират в среда със съответните концентрации на изследвания РФ в продължение на 48ч. За установяване на клетъчния брой се използва Cytell™ Cell Cycle Kit (GE Healthcare). Активното вещество в комплекта (Reagent G) се свързва с ДНК в клетъчното ядро.

Използваният протокол е по препоръки на производителя:

- Фиксиране на клетъчните култури с леденостуден метанол
- Инкубиране с т.нар. Reagent G за 45 мин. на 37^{o}C
- Наблюдаване на препаратите с IN Cell Analyzer 6000 imaging system

Отчитане и анализ със софтуер-In Cell Analyzer Workstation 3.7.3

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

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

Прави се флоуцитометричен анализ за следните маркери:

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

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

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

В експеримента се използват:

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

  Анти-CD 105/ендоглин IgG (Santa Cruz)

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

Анти-COL1a2 IgG (Santa Cruz)

Анти-COL3a1 IgG (Santa Cruz)

Анти-BSPII IgG (Santa Cruz)

АнтиSPARC IgG (Santa Cruz)

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

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

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

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

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

- Клетките в културелния съд се измиват с PBS за 5 мин.
- Инкубиране с 2ml 0,05% трипсин/ЕДТА за 10 мин.
- Разпределяне на клетките по равен брой в пластмасови епруветки
- Третиране с разтвор на 2% BSA в PBS, за да бъдат блокирани неспецифичните места за свързване на антителата. Пропускането на тази стъпка може да доведе до фалшиво позитивни резултати
- Измиване на клетките с PBS за 5 мин.
- Инкубиране на клетките за 30 мин. на стайна температура (19^{o}-25^{o}C) с първичното антитяло, предварително разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:250
- Антитяло CD146, което е директно конюгирано с флуорохром, се разрежда в 2% BSA-PBS в съотношение 1:1000; инкубира се също за 30 мин. на стайна температура
- Измиване на клетките, белязани с моноклонални антитела (неконюгирани с флуорохром) с PBS за 5 мин.
- Маркиране на първичните моноклонални антитела, неконюгирани с флуорохром чрез инкубиране с вторични, конюгирани с флуоресцентен маркер за 20 мин. на тъмно
- След всяко измиване, клетките се центрофугират за 4 мин. на 3000 оборота/мин.

Протокол за белязане на вътрешноклетъчни маркери, чрез клетъчно пермеабилизиране:

- Използван е PerFix-nc Kit (Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland) , съгласно инструкциите на производителя. Комплектът включва 3 реагента: буфер

№1 Фиксиращ реагент, буфер №2 Пермеабилизиращ реагент и буфер №3 Финален разтвор.

- Клетките в културелния съд се измиват с PBS за 5 мин.
- Инкубиране с 2ml 0,05% трипсин/ЕДТА за 10 мин.
- Отлепените клетки се ресуспендират в 50µL PBS
- Добавяне на 5µL от буфер №1 и щателно разбъркване
- Инкубиране за 15 мин.
- Добавяне на 300µL от буфер №2 заедно с първичното антитяло (разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:250)
- Инкубиране за 30 мин.
- Прибавяне на вторичното антитяло, конюгирано с флуорохром (разредено в 2% BSA-PBS в съотношение 1:1000)
- Инкубиране за 15 мин.
- Прибавяне на буфер №3 разреден в PBS до получаване на краен обем 1ml

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

4.Изследване ефекта на PDGF-BB върху колагеновия синтез

4.1.Количествено определяне на тоталния разтворим колаген

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

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

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

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

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



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

4.2.Изследване активността на лизил оксидаза (lysyl oxidase-LOX).

Клетки, изолирани от ПДЛ (между 1-ви и 4-ти пасаж) се засяват в 12-ямкови плаки с гъстота 10 000 клетки/cm^2. Те се култивират при стандартни условия: DMEM с добавени антибиотици и 10% ФТС за 24ч. След този период средата се сменя с безсерумна, която съдържа 1% ITS. Към хранителната среда се добавя и по една от

следните концентрации на РФ PDGF-BB: 1ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml. Клетки, третирани в среда само с ITS без РФ служат за контрола. Клетките се култивират в продължение на една седмица.

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

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

Китът съдържа:

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

Реагентите се подготвят за експеримента според препоръките на производителя

Протокол:

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

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

5.Изследване влиянието на PDGF-BB върху остеогенната диференциация на стволови клетки от периодонтален лигамент

5.1.Изследване на алкалнофосфатазна (alkaline phosphatase-ALP)-активност

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

ALP има способността да катализира хидролизата на фосфатните естери до алкални буфери. Образуват се органични радикали и неорганични фосфати. Експериментът се отчита с Alkaline Phosphatase Assay Kit (Fluorometric) (Abnova, Taipei, Taiwan) съобразно инструкциите на производителя. Ефективността му се базира на способността на ALP да отделя фосфатните групи от нефлуоресцентния 4-метилумбелиферил фосфат динатриева сол – 4-Methylumbelliferyl phosphate disodium salt (MUP) substrate. В резултат се получава интензивно флуоресцентен сигнал.

Китът съдържа:

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

Реагентите се подготвят за експеримента според препоръките на производителя.

Протокол:

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

- Изчисляването на ALP активност се извършва по следната формула, предложена от производителя:

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

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

5.2.Цитохимично оцветяване на калциевите отлагания с Alizarin red.

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

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

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

- Аспириране на хранителната среда
- Измиване на клетките с PBS триктатно
- Оцветяване с 2g/ml alizarin red S за 5-10 мин.
- Измиване с PBS трикратно
- Оцветените препарати се снимат макроскопски (наблюдават се с просто око) и се наблюдават с фазово-контрастен микроскоп (Leica, DMRE, Leica Microsystems GmbH, Germany).

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

6.Статистически анализ

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

- Дескриптивна статистика
  - средна аритметична – за оценка на централната тенденция;
  - стандартно отклонение – за оценка на разсейването;
  - графично представяне на резултатите.
- Оценка на параметри – доверителен интервал на средната аритметична.
- Метод на повторно вземане на проба – многократни повторения (Bootstrap methods) – за по-точна оценка на доверителните интервали. Методът може да се прилага при по-малък обем извършени проби.
- Т-тест – при сравняване на две независими групи.
- Т-тест – при сравняване на две зависими групи (повторни измервания).

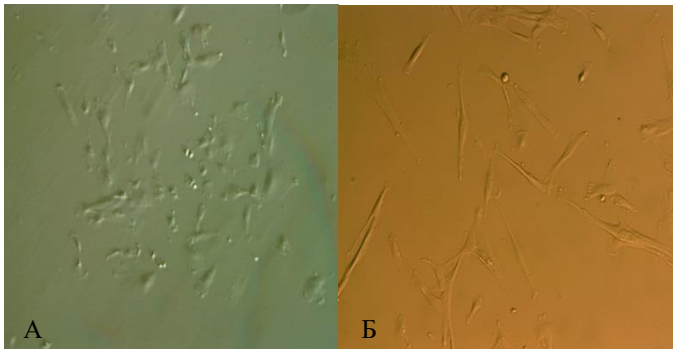
Използваното критично ниво на значимост е $\alpha=0,05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато Р стойността (P-value) е по-малка от α. За обработка на данните от проучването е използван специализирания статистически пакет SPSS версия 13.0.

IV.РЕЗУЛТАТИ

РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 1

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

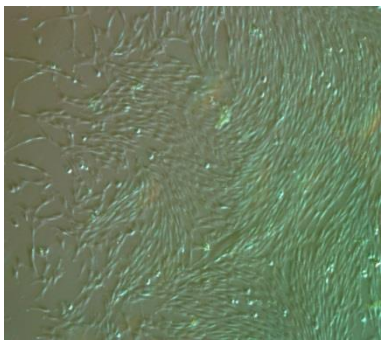
Тъканните експлантати се изолират от средната трета на кореновата повърхност на интактни трети молари. След ензимната обработка на ПДЛ се получава суспензия от единични клетки. Средно около 3-4 дни след посяването на лизираните тъканни експлантати започват да се наблюдават първите единични адхезирали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



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

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

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



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



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

РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 2

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

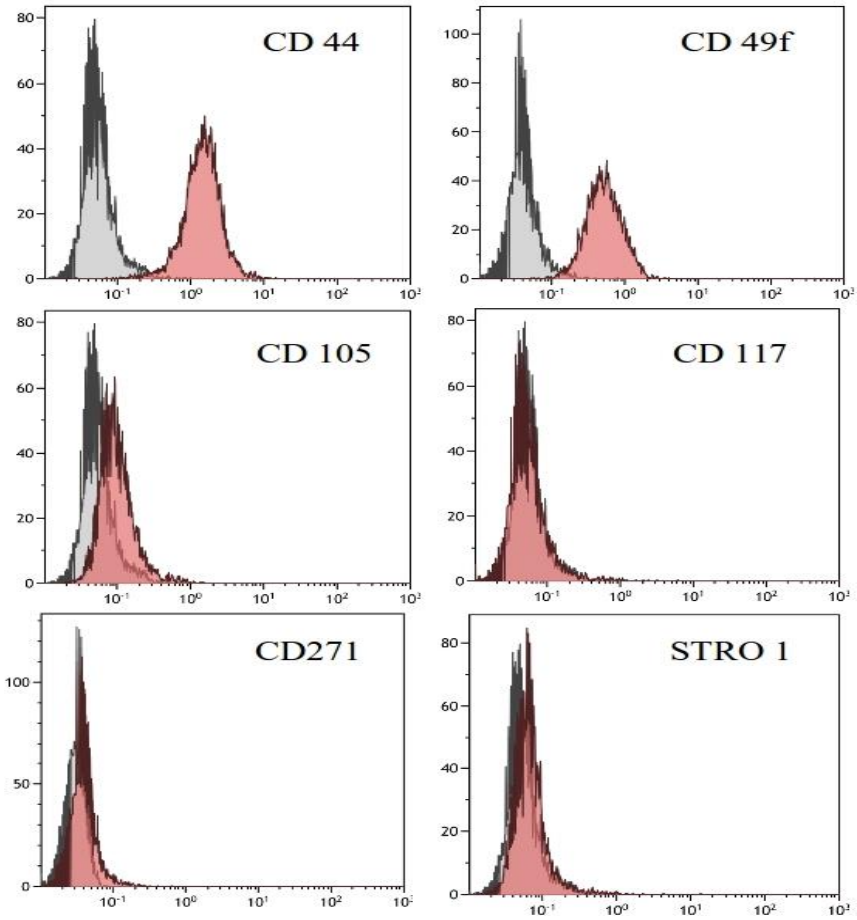
1.Флоуцитометричен анализ: чрез този метод се прави количествена оценка на това, какъв процент от клетките в хетерогенната култура експресира търсените маркери. Изследва се експресията на маркери, типични за ембрионални и недиференцирани МСК: CD44, CD49f, CD105, CD117, CD271, STRO-1.

Резултатите показват, че CD44 се експресира в 99,8% ± 0,06%, CD49f-в 97,5% ± 0,87%, CD105-в 35,14% ± 3,2%, CD117-в 5,5% ± 1,29%, CD271-в 7,6% ± 1,6%, STRO-1-в 4,3% ± 0,7%. Хистограмите, изразяващи експресията на съответните маркери спрямо негативната контрола са представени на *Фиг. 9*.

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

Трите маркера с най-висока експресия при изследваните от нас периодонтални МСК са CD44, CD49f и CD105. Високата експресия на три маркера е достатъчно условие, за да се твърди, че получената култура е съставена основно от МСК.

Останалите маркери също се експресират от клетките в ПДЛ, но в по-ниска степен. Изясняването и доказването на стволовоклетъчния фенотип е задължителен етап в началото на експерименталната работа с МСК.



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

Експресия
Негативна контрола

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

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

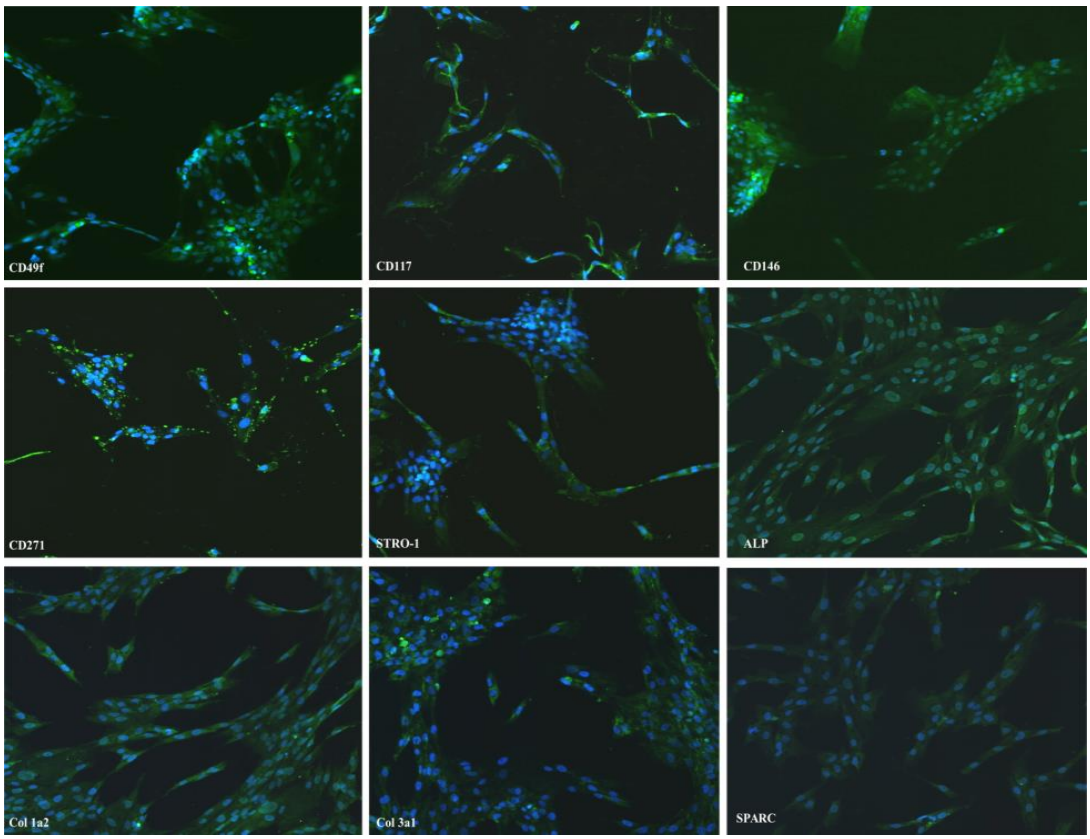
Клетките реагират положително, както при оцветяване със стволовоклетъчни маркери, така и с маркери, които са характерни за минерал-продуциращи тъкани и за два

от най-разпространените типове колаген. Изображенията, получени при този експеримент потвърждават наличието на МСК в човешки ПДЛ.

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

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

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

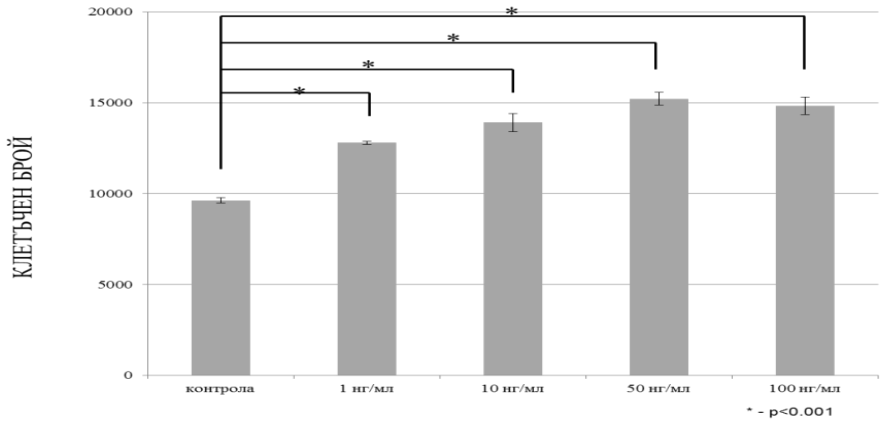


Фиг. 10 Имунофлуоресценция на клетки, изолирани от ПДЛ, белязани със стволовоклетъчни и диференциационни маркери. Увеличение x50.

РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 3

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

Резултатите от проведения тест за клетъчна пролиферация доказват, че PDGF-BB проявява силен митогенен ефект върху периодонтални МСК. Всички концентрации на РФ, включени в експерименталната постановка активират клетъчното делене при сравнението с контролни клетки, култивирани в среда без добавен PDGF-BB. Подобно на други активни молекули се установява, че PDGF-BB проявява силен концентрационнозависим ефект върху пролиферацията на стволовите клетки. От *Фиг. 11* става ясно, че с повишаване на концентрацията на PDGF-BB до 50ng/ml значимо се увеличава броя клетки, респ. стимулира се клетъчната пролиферация. Петдесет ng/ml е оптималната концентрация за стимулиране на клетъчната пролиферация. При по-висока концентрация на РФ (100ng/ml) митогенният ефект започва слабо да се понижава.



Фиг. 11 Увеличаване на броя стволови клетки, изолирани от ПДЛ след 48ч. инкубиране в хранителни среди с различни концентрации на PDGF-BB. Ефектът на РФ върху клетъчната пролиферация е дозозависим.

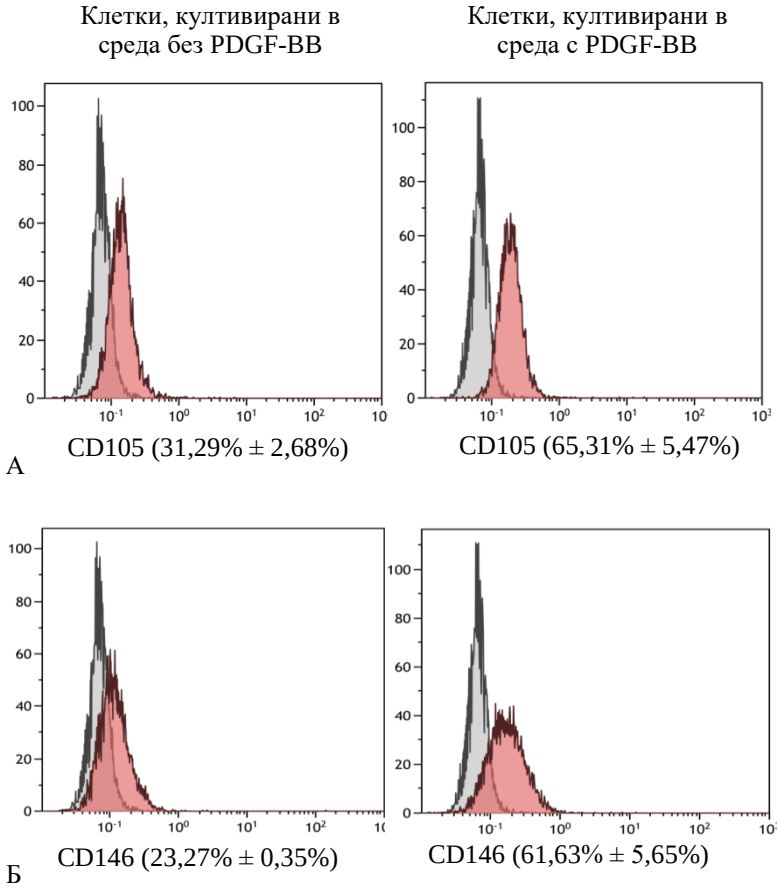
РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 4

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

Клетки, изолирани от ПДЛ се култивират в условия на безсерумна среда с PDGF-BB в концентрация 50ng/ml и в такава без добавен РФ. Чрез флоуцитометричен анализ се

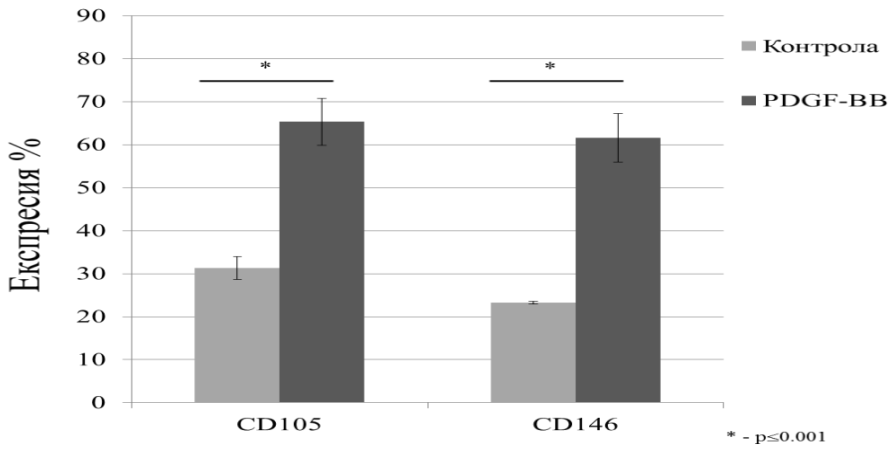
установява влиянието на PDGF върху способността на клетките да експресират повърхностни стволовоклетъчни маркери. Избраните маркери са CD105 и CD146. Експресията на двата маркера, както за третираните с PDGF-BB стволови клетки, така и за нетретираните се сравнява най-напред с негативна контрола. Като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

На *Фиг. 12* са показани хистограмите – резултат от флоуцитометричен анализ, които сравняват експресията на маркери спрямо негативна контрола; на *Фиг. 13* се сравнява експресията между клетки култивирани в среда с добавен PDGF-BB и такива, култивирани в среда без РФ.



Фиг. 12 Флоуцитометричен анализ на клетки от ПДЛ, демонстриращ ефекта на PDGF-BB върху експресията на стволовоклетъчни маркери. Експресията на съответните маркери е съпоставена спрямо негативна контрола от клетки оцветени с антитяло CD4.

Експресия
Негативна контрола



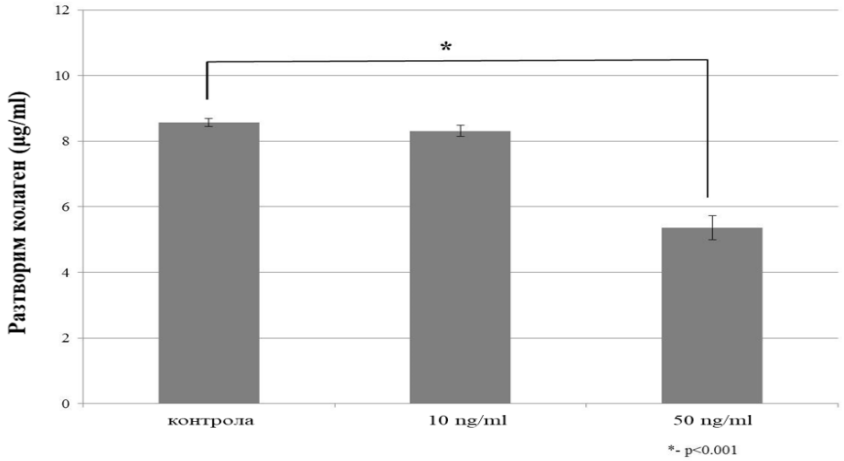
Фиг. 13 Експресия на стволовоклетъчни маркери при клетки от ПДЛ, култивирани в безсерумна среда с добавен PDGF-BB и сравнението им с клетки, култивирани в среда без PDGF-BB-контрола. PDGF-BB засилва експресията на стволовоклетъчните маркери CD105 и CD146.

РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 5

Определяне на колагеновия синтез и матурация при МСКПДЛ след третиране с PDGF-BB

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

Функционалната активност на клетки, изолирани от ПДЛ за производство и секреция на общ колаген в хранителната среда се изследва посредством Sircol Collagen Assay Kit. Целта е да се установи какъв е ефектът на две различни концентрации на РФ PDGF-BB (10ng/ml и 50ng/ml), включени в хранителна среда без ФТС и да се сравни с контрола. Контролата представляват клетки, култивирани в безсерумна хранителна среда, в която не е включен РФ (0ng/ml PDGF-BB). Резултатите показват, че има концентрационнозависимо понижение в колагеновата продукция (*Фиг. 14*). При клетки, третирани с по-ниската концентрация на РФ (10ng/ml) не се наблюдава значима разлика в сравнение с контролата. При резултатите с 50ng/ml PDGF-BB вече се установява статистически значимо понижаване на колагеновия синтез.

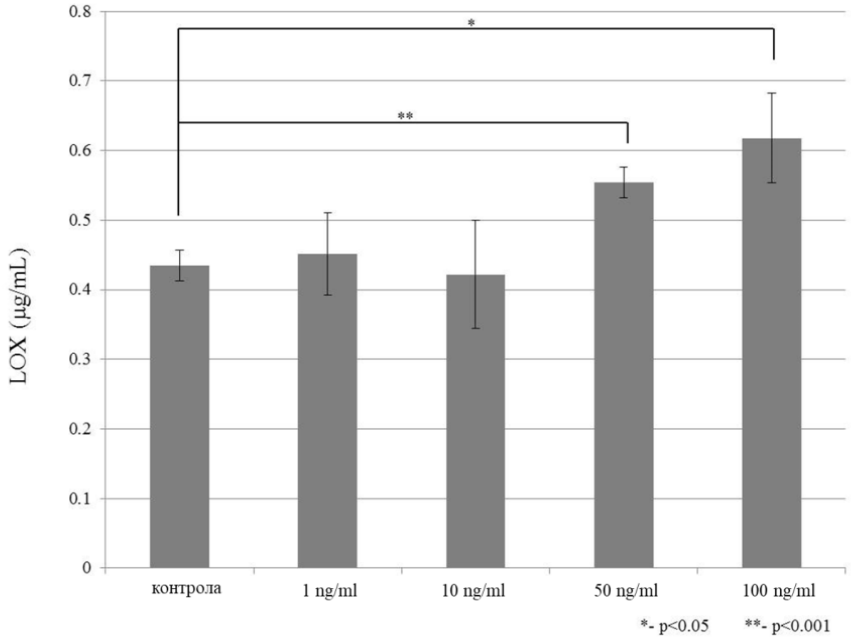


Фиг. 14 Количество синтезиран и секретиран общ колаген в средата след 5-дневно култивиране на клетки, изолирани от ПДЛ третирани с различни концентрации на РФ.

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

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

Резултатите от изследването показват, че ниските концентрации на РФ не влияят върху активността на ензима. От друга страна, при третиране на клетките с по-високи концентрации PDGF-BB (50 и 100ng/ml) се наблюдава статистически значимо увеличение на ензимната активност спрямо контролата и спрямо по-ниските приложени концентрации на РФ (*Фиг. 15*). Резултатите отново показват, че ефектите на РФ основно зависят от концентрацията на активната молекула.



Фиг. 15 Определяне на активността на ензима LOX в супернатанта на стволови клетки, изолирани от ПДЛ след едноседмично култивиране в среда с добавен PDGF-BB в няколко концентрации. За контрола се използва супернатанта от клетки, отглеждани в среда само с ITS (1%) без добавен РФ.

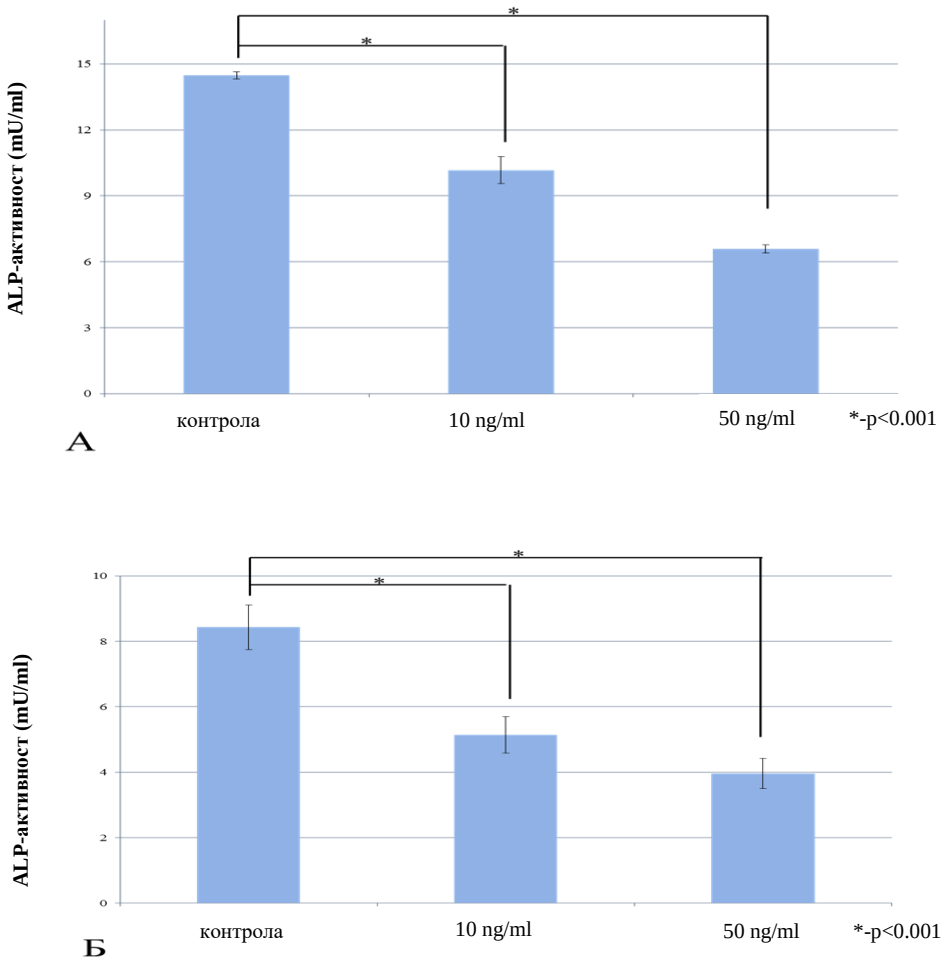
РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 6

Изследване влиянието на PDGF-BB върху остеогенната диференциация на клетки от ПДЛ

1.Изследване на ALP-активност на клетъчни култури от ПДЛ.

Посредством функционален тест се установява ALP-активност на стволови клетки от ПДЛ, след едноседмично третиране на културите с PDGF-BB в две различни концентрации (10ng/ml и 50ng/ml). На *Фиг. 16А,Б* е показано влиянието на РФ върху активността на този ензим в изследваните клетки. Изследва се количеството ензим в супернатантата и в клетъчния слой – едновременно за двата компонента и независимо един от друг. След това се изчислява ALP-активност по формула, предложена от производителя на приложения в изследването кит.

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



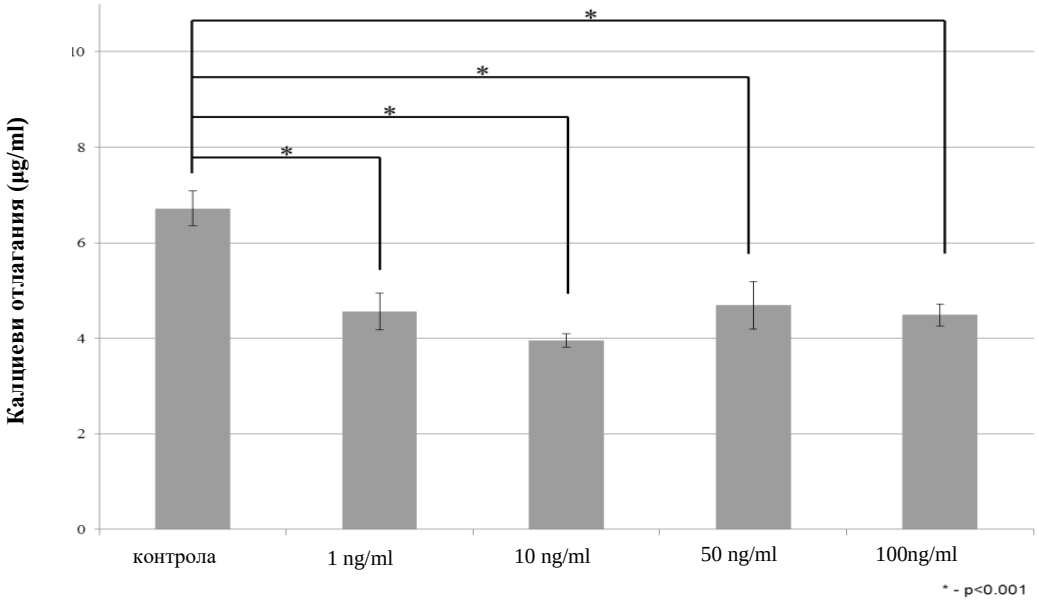
Фиг. 16 Отчитане на ALP-активност на МСКПДЛ след едноседмично третиране с различни концентрации PDGF-BB. А - ALP-активност в супернатанта, Б – ALP-активност в клетъчния слой.

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

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

Остеогенната диференциация се определя с багрилото Alizarin red за оцветяване на калциеви натрупвания в керемиденочервен цвят, след триседмично култивиране на МСКПДЛ. Това време е необходимо за образуване на достатъчно калциеви отлагания, които да бъдат визуализирани чрез теста. Данните от количествената оценка от експеримента са представени на *Фиг. 17*.

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



Фиг. 17 Количествен израз на способността на СКПДЛ, култивирани в условия с различни концентрации на РФ, да образуват калциеви отлагания. Количеството багрило (Alizarin red) е изразено в µg/ml.

V.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заключение по задача 1

В ПДЛ на постоянни зъби има наличие на популации от стволови клетки с мезенхимен произход. Периодонтални МСК се изолират и култивират успешно в подходящи *in vitro* условия.

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

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

Заключение по задача 2

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

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

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

Заключение по задача 3

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

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

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

Заключение по задача 4

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

Заключение по задача 5

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

Изследван е ефектът на PDGF-BB върху активността на LOX – основен екстрацелуларен ензим, отговорен за формирането на интра- и интермолекулярни ковалентни връзки между колагеновите вериги. Резултатите ни показват, че по-високите концентрации на РФ повишават ензимната активност на LOX. PDGF-BB повишава и експресията на SPARC при МСКПДЛ. SPARC притежава активност, сходна с тази на LOX по отношение на колагена в ЕЦМ. Това означава, че функцията на PDGF-BB насочена по-скоро към иницииране и поддържане на колагеновата матурация екстрацелуларно. РФ води до стабилизиране на вече синтезираните протеинови

молекули в извънклетъчното пространство и понижаване на разтворимостта им. PDGF-BB участва във формирането на пълноценен периодонтален ЕЦМ.

Заключение по задача 6

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

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

Информацията, която получаваме от резултатите има основно практическо значение за правилното приложение на рекомбинантната форма на PDGF-BB в клиничната практика. Установеният модел на влияние на rhPDGF-BB върху МСКПДЛ може да служи като основа за разработване на терапевтични методики, които да подобрят условията за интеграция на дентални имплантати, да подпомогнат регенерацията при реплантиране на експулсирани зъби, при хирургично лечение на пародонтални костни лезии и т.н.

VI.ИЗВОДИ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VII.ПРИНОСИ

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

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

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

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

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

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

VIII.СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ

Mihaylova Z, Tsikandelova R, Stanimirov P, Gateva N, Mitev V, Ishkitiev N. Role of PDGF-BB in proliferation, differentiation and maintaining stem cell properties of PDL cells *in vitro*. *Arch Oral Biol* **IF:1.748**(Публикувана в интернет октомври 2017г.) https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.019

Mihaylova Z, Stanimirov P, Tsikandelova R, Ishkitiev N, Mitev V. Methods for proliferation, differentiation and collagen production studies of PDL stem cells. *Int J Sci Res*, 2017; 6: 1004-1007.

Mihaylova Z, Stanimirov P, Mitev V, Ishkitiev N. Platelet-Derived Products and Periodontal Ligament Stem Cells. *Arch Stem Cell Res*, 2015; 2(1): 1006.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Mihaylova Z, P. Stanimirov, N. Ishkitiev, V. Mitev, R. Tsikandelova, V. Dimitrova. Effect of PDGF-BB on Periodontal ligament stem cell cultures – орална презентация, *94th General Session& Exhibition of the International Association for Dental Research, юни 2016, Сеул, Южна Корея*

Mihaylova Z, Mitev V, Stanimirov P, Tsikandelova R, Ishkitiev N. Role of PDGF-BB in human PDL stem cells proliferation, matrix synthesis and mineralization - постерна презентация, *ISSCR 2017 Annual meeting; Бостън, САЩ 14-17 юни*

Изказвам специална признателност и благодарност на моите научни ръководители акад. проф. д-р Ваньо Митев, дм, дбн и доц. д-р Павел Станимиров, дм за тяхната подкрепа в професионалното ми развитие, за ценните идеи и насоки, за това, че изградиха в мен дисциплина и сериозно отношение към работата.

Изказвам дълбока благодарност и почит към моя учител проф. д-р Радомир Угринов, дм, дмн.

Благодаря на д-р Николай Ишкитиев и колегите от Катедрата по Медицинска химия и биохимия, МФ, МУ-София, които ми помагаха в трудния път на научното израстване и за списването на дисертационния труд.

Сърдечно благодаря на моите родители, които винаги са били до мен и ме научиха да се трудя.