



Д-р Зорница Господинова Михайлова, дм

На 18.12.2017г. успешно беше защитен дисертационен труд на тема **„ЕФЕКТ НА PDGF-BB ВЪРХУ СТВОЛОВОКЛЕТЪЧНИТЕ СВОЙСТВА И ДИФЕРЕНЦИАЦИЯТА НА КЛЕТКИ ОТ ПЕРИОДОНТАЛЕН ЛИГАМЕНТ *in vitro*“** от д-р Зорница Господинова Михайлова, катедра Орална и лицево-челюстна хирургия, ФДМ, МУ-София с научни ръководители акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев и доц. д-р Павел Кирилов Станимиров. На д-р Зорница Господинова Михайлова е присъдена ОНС „Доктор“.

Дисертационният труд съдържа 203 страници и е онагледен с 10 таблици и 26 фигури. Библиографията включва 321 литературни източника, от които 4 на кирилица и 317 на латиница.

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.

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 екстрахираните нормално пробии, 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 екстрахираните 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 антимиотик – 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 определяне 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)

Изводи:

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

2.1. 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.

2.2. 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.

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

3.2. 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 броят клетки в популацията е най-значимо увеличен. PDGF-BB стимулира преминаването на клетките в активна фаза на делене (G2/M) от клетъчния цикъл.

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

5.1. 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.

5.2. 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.

6. 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.

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 основните процеси, свързани с тъканната регенерация в клетъчни култури от МСКПДЛ, а именно процесите на синтез и матурация на колагена, както и минерализацията.