



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Neringa Vičiūnaitė

**SKIRTINGŲ TITANO IMPLANTŲ PAVIRŠIAUS MODIFIKAVIMO
STRATEGIJŲ POVEIKIS DANTENŲ FIBROBLASTŲ SAVYBĖMS**

**THE INFLUENCE OF DIFFERENT MODIFICATION STRATEGIES OF
TITANIUM IMPLANT SURFACES ON GINGIVAL FIBROBLASTS
PROPERTIES**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Bioinžinerijos specializacija

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2012

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ fakultetas

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

habil. dr. prof. Juozas Kulys
(Vardas, pavardė)

(Data)

Neringa Vičiūnaitė

**SKIRTINGŲ TITANO IMPLANTŲ PAVIRŠIAUS MODIFIKAVIMO
STRATEGIJŲ POVEIKIS DANTENŲ FIBROBLASTŲ SAVYBĖMS**

**THE INFLUENCE OF DIFFERENT MODIFICATION STRATEGIES OF
TITANIUM IMPLANT SURFACES ON GINGIVAL FIBROBLASTS
PROPERTIES**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Bioinžinerijos specializacija

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas dr. Daiva Baltriukienė

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas dr. Evaldas Liutkevičius

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas doc. dr. Angelė Kaulakienė

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2012

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Biotechnologijos studijų kryptis

Katedros vedėjas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Bioinžinerijos specializacija

(Parašas)

habil. dr. prof. Juozas Kulys
(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.
Vilnius

Studentei Neringai Vičiūnaitei

Baigiamojo darbo tema: Skirtingų titano implantų paviršiaus modifikavimo strategijų poveikis dantenų fibroblastų savybėms.

patvirtinta 2011 m. spalio mėn. 26 d. dekanų potvarkiu Nr. 380fm.

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2012 m. birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTYS:

- Gauti ir charakterizuoti pirminių dantenų fibroblastų liniją;
- Įvertinti dantenų fibroblastų adheziją ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršiaus;
- Palyginti skirtingos topografijos paviršių poveikį ląstelių proliferacijos intensyvumui;
- Iširti signalinių molekulių – FAK ir Akt, raišką/aktyvinimą dantenų fibroblastų ląstelėse;
- Įvertinti gautos pirminės ląstelių linijos osteogeninį potencialą.

Vadovė

dr. Daiva Baltriukienė
(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(parašas)

(data)

Konsultantas

dr. Evaldas Liutkevičius
(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(parašas)

(data)

Užduotį gavau

.....
(Parašas)

Neringa Vičiūnaitė
(Vardas, pavardė)

.....
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-....-....

Bioinžinerijos studijų programos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas: **Skirtingų titano implantų paviršiaus modifikavimo strategijų poveikis dantenų fibroblastų savybėms**

Autorius: **Neringa Vičiūnaitė** Vadovas: **dr. Daiva Baltriukienė**

Kalba

X lietuvių
užsienio

Anotacija

Baigiamajame darbe įvertintas skirtingų titano implantų paviršiaus modifikavimo strategijų poveikis pirminių dantenų fibroblastų savybėms – adhezijai, proliferacijai ir diferenciacijai. Tyrimuose naudoti titano mėginiai, kurių paviršiaus šiurkštumas pakeistas fizikiniais metodais – smėliasrove ir lazeriu. Iš gingivektomijos metu paimto žmogaus dantenų subepitelinio audinio buvo išskirtos ir charakterizuotos dantenų fibroblastų ląstelės. Tiriant šių ląstelių adheziją ant modifikuotų titano mėginių paviršių nustatyta, kad ankstyvuojų laikotarpiu dantenų fibroblastų adhezija buvo panaši ant visų tirtų įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršių, tačiau vėliau efektyviausias ląstelių prikibimui paviršius buvo lazeriu suformuotos grotelės. Siekiant pagerinti modifikuotų titano paviršių adheazines savybes, jie papildomai buvo padengti tarpląstelinio užpildo baltymais – kolagenu ir lamininu, įvertintas tokio padengimo poveikis ląstelių prikibimui ir augimui. Analizuojant mechanizmus, reguliuojančius ląstelių adhezijos ant modifikuotų paviršių procesus, buvo tirta FAK ir Akt kinazių raiška ir aktyvinimas. Vertinant karkasų paviršiaus topografijos poveikį ląstelių diferenciacijai, buvo palygintas osteogeninės diferenciacijos laipsnis ląstelėse augintose ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršių.

Darbą sudaro 6 dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – p. teksto be priedų, 24 pav., 2 lent., 104 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: mezenchiminės kamieninės ląstelės; dantenų fibroblastai; titanas; dantų implantai; adhezija; proliferacija; osteogeninė diferenciacija; FAK; Akt.

Vilnius Gediminas Technical University
Fundamental science faculty
Chemistry and bioengineering department

ISBN ISSN
Copies No.
Date-....-....

Bioengineering study programme master thesis.

Title: **The influence of different modification strategies of titanium implant surfaces on gingival fibroblasts properties**

Author **Neringa Vičiūnaitė** Academic supervisor **doc. Daiva Baltriukienė**

Thesis language

☐

Lithuanian

☒

Foreign (English)

Annotation

The influence of different modification strategies of titanium implant surfaces on gingival fibroblasts properties - adhesion, proliferation, and differentiation was studied in this final master thesis. Different titanium surface roughness modifications using physical methods such as sand-blasting as well as laser irradiation were developed. Gingival fibroblasts derived from human gingival subepithelial tissues obtained during gingivectomy were isolated and characterized. The data suggested that the initial adhesion between tested cells and various modified titanium surfaces was similar, but the most efficient surface for subsequent cell attachment was laser-ablated holey arranged in grid-like structures. Additionally, in order to improve the modified titanium surface adhesion properties, these surfaces were coated by extracellular matrix proteins - collagen and laminin. The coating influence on the cell growth and adhesion was evaluated. To analyze the mechanisms regulating cell adhesion processes on the modified surfaces, FAK and Akt kinase expression as well as activation were studied. In order to evaluate the effect of surface topography on cell differentiation, the level of osteogenic differentiation was compared.

Structure: introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions, references.

Keywords: mesenchymal stem cells; gingival fibroblasts; titanium; dental implants; adhesion; proliferation; osteogenic differentiation; FAK; Akt.

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų
sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo
organizavimo tvarkos aprašo 2010–2011 m. m.
6 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Neringa Vičiūnaitė, VGTU1026476

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerijos, Bifm – 10

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO
SĄŽININGUMO DEKLARACIJA**

2012 m. gegužės 31 d.
(Data)

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema _____
Skiritngų titano implantų paviršiaus modifikavimo strategijų poveikis dantenų fibroblastų
savybėms

patvirtintas 20 11 m. spalio mėn. 26 d. dekanų potvarkiu Nr. 380fm, yra
savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar
netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo
mokslininkai ir specialistai: dr. Evaldas Liutkevičius,

lietuvių kalbos konsultantas doc. dr. Angelė Kaulakienė.

Mano darbo vadovė dr. Daiva Baltriukienė.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų
piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjusi.

NERINGA VIČIŪNAITĖ

(Parašas)

(Vardas ir pavardė)

TURINYS

Paveikslų sąrašas	8
Santrumpų sąrašas	9
IVADAS	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Dantis supančių audinių sąveika su dantų implantais	13
1.1.1. Periodontitas, jo priežastys ir pasekmės	13
1.1.2. Minkštųjų audinių sąveika su implantu	15
1.1.3. Implantų paviršiaus modifikavimo strategijos	15
1.2. Kamieninės ląstelės ir jų naudojimas odontologijoje	17
1.2.1. Suaugusio organizmo kamieninės ląstelės	17
1.2.2. Burnos audinių kamieninės ląstelės	18
1.2.3. Kamieninių ląstelių diferenciacijos galimybės	20
1.3. Ląstelių žūties būdai – apoptozė ir nekrozė	22
1.4. Tarpląstelinis užpildas	24
1.5. Sutelktinis sąlytis ir jo aktyvinami signaliniai keliai	26
1.5.1. Sutelktinis sąlytis – fokalinė adhezija	26
1.5.2. FAK signalinis kelias	27
1.5.3. PI3K/Akt signalinis kelias	29
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	31
2.1. Naudotos medžiagos	31
2.2. Tyrimo metodai	32
2.2.1. Protezinių mėginių gamyba ir paruošimas eksperimentams	32
2.2.2. Dantenu biopsija, dantenu fibroblastų išskyrimas ir pirminių ląstelių linijų gavimas	32
2.2.3. Ląstelių auginimas <i>in vitro</i>	32
2.2.4. Ląstelių skaičiaus ir jų gyvybingumo įvertinimas tripano mėliu	33
2.2.5. Ląstelių gyvybingumo vertinimas su AO/EB mišiniu	33
2.2.6. Ląstelių adhezijos vertinimas naudojant XTT	34
2.2.7. Ląstelių proliferacijos vertinimas naudojant MTT	34
2.2.8. Mėginių paruošimas skenuojančiai elektroninei mikroskopijai	35
2.2.9. Ląstelių charakterizavimas	36
2.2.10. Imunofermentinė reakcija ląstelių pagrindu	36
2.2.11. Titaninių mėginių dengimas kolagenu ir lamininu	37
2.2.12. Diferenciacijos iniciacija osteogenine linkme	37
2.2.13. Statistinė duomenų analizė	37
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	38
3.1. Titano mėginių paruošimas ir jų paviršiaus modifikavimas	38
3.2. Dantenu fibroblastų linijų gavimas ir jų charakterizavimas	39
3.3. Dantenu fibroblastų sąveikos su įvairiai modifikuotais titano mėginių paviršiais tyrimas	42
3.3.1. Titano mėginių citotoksiškumo vertinimas	42
3.3.2. Ląstelių adhezijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršiaus analizė	43
3.3.3. Dantenu fibroblastų proliferacijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių palyginimas	45
3.3.4. Tarpląstelinio užpildo komponentų vaidmens tyrimas	46
3.3.5. Signalinių molekulių raiškos/aktyvinimo tyrimas	47
3.3.6. Osteogeninės diferenciacijos vertinimas	49
3.4. Rezultatų apibendrinimas	52
IŠVADOS	54
Literatūros sąrašas	55
Padėka	62

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Priedančio audiniai ir pagrindinės danties dalys.....	13
2 pav. Prarasto danties pakeitimas implantu.....	14
3 pav. Kamieninių ląstelių diferenciaciją reguliuojantys veiksniai.....	20
4 pav. Kamieninės ląstelės diferenciacija osteogenine linkme.....	21
5 pav. Tarpląstelinio užpildo ir ląstelės sąveika.....	24
6 pav. Kolageno gijos ir skaidulos jungiamajame audinyje.....	25
7 pav. MAP kinazių aktyvinimas dalyvaujant sutelktinių sąlyčių kinazei.....	27
8 pav. FAK ir jos aktyvinami signaliniai keliai.....	28
9 pav. PI3K/Akt signalinis kelias.....	29
10 pav. Diferencijuotas ląstelių dažymas AO/EB dažų mišiniu.....	34
11 pav. MTT redukcijos reakcija.....	35
12 pav. Titano mėginiai ir jų paviršiaus modifikavimo būdai.....	39
13 pav. Žmogaus dantenų fibroblastų linijos ląstelės, auginamos <i>in vitro</i>	39
14 pav. Paviršiaus ir viduląstelinio žymenų raiška ŽDF ląstelėse.....	41
15 pav. Įvairiai modifikuotų titano mėginių citotoksiškumo ŽDF tyrimas, naudojant diferencijuotą dažymą AO/EB dažų mišiniu.....	42
16 pav. Kokybinė ląstelių adhezijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršiaus analizė SEM metodu po 24 ŽDF auginimo ant jų valandų.....	43
17 pav. Kiekybinis ŽDF ląstelių adhezijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršiaus vertinimas XTT metodu.....	44
18 pav. Dantenų fibroblastų proliferacijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių palyginimas MTT metodu.....	45
19 pav. Dantenų fibroblastų skaičiaus palyginimas ant įvairiai modifikuotų titano mėginių padengtų tarpląstelinio užpildo komponentais po 24 val. nuo ląstelių išsėjimo.....	46
20 pav. FAK ir fosfo – FAK baltymų lygis dantenų fibroblastuose 24 val. augintuose ant įvairiai modifikuotų titano mėginių.....	48
21 pav. Akt ir fosfo – Akt baltymų lygis dantenų fibroblastuose 24 val. augintuose ant įvairiai modifikuotų titano mėginių.....	49
22 pav. ŽDF ląstelių diferenciacija osteogenine linkme.....	50
23 pav. Ant įvairiai modifikuotų Ti karkasų augintų ŽDF ląstelių diferenciacija osteogenine linkme.....	51
24 pav. Kiekybinis osteogeninės ŽDF ląstelių, augintų ant įvairiai modifikuotų Ti karkasų, diferenciacijos įvertinimas.....	51

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- Akt (*angl.* protein kinase B: PKB) – serino / treonino specifinė baltymų kinazė
- AO – akridino oranžas
- ASC (*angl.* adipose stem cells) – riebalų kamieninės ląstelės
- CAD (*angl.* computer aided design) – kompiuterinė modeliavimo programinė įranga
- CO₂ – anglies dioksidas
- D5 – CAM (*angl.* computer aided manufacturing) – kompiuteriu kontroliuojama frezavimo įranga (D5, Datron)
- DFSC (*angl.* stem cells from the dental follicle) – dantenų folikulo kamieninėse ląstelės
- DNR – deoksiribonukleorūgštis
- EB – etidžio bromidas
- EDTA – etilendiamino tetraacto rūgštis
- EGF (*angl.* epidermal growth factor) – epidermio augimo faktorius
- EM (*angl.* extracellular matrix) – tarpląstelinis užpildas
- ERK (2) (*angl.* extracellular signal – regulated kinases) – ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė
- FAK (arba PTK2) (*angl.* focal adhesion kinase) – fokalinės adhezijos kinazė
- FB – fosfatinis buferis
- FVS – fetalinis veršelio serumas
- GAG – glikozaminoglikanai
- GT – MSC (*angl.* gingival tissue – derived mesenchymal stem cells) – dantenų kilmės mezenchiminės ląstelės
- H₂SO₄ – sieros rūgštis
- ILK (*angl.* integrin – linked kinase) – su integrinais susijusi kinazė
- IMDM – Iscove's modifikuota Dulbeco terpė
- MAP (*angl.* mitogen – activated protein kinase) – augimo veiksmų aktyvinamos baltymų kinazės
- MTT (3 – (4,5 – dimetiltiazol – 2 – yl) – 2,5 – difeniltetrazolio bromidas
- OH – hidroksido grupė
- PDGF (*angl.* platelet – derived growth factor) – plokštelių (trombocitų) kilmės augimo faktorius
- PK1 (*angl.* pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1) – nuo fosfoinozitudų priklausoma kinazė 1
- PDLSC (*angl.* periodontal ligament stem cells) – periodonto raiščio kamieninės ląstelės
- PH – plekstrino homologija
- PI3K (*angl.* phosphatidylinositol 3 – kinases) – fosfatidylinozitol – 3 kinazė

PIP2 (*angl.* phosphatidylinositol (4, 5) – bisphosphate) – fosfatidilinozitol 4, 5 – trifosfatas
PIP3 (*angl.* phosphatidylinositol (3, 4, 5) – trisphosphate) – fosfatidilinozitol 3, 4, 5 – trifosfatas
Ras (*angl.* related proteins) – tarpląstelinių signalų perdavimo tarpininkas, GTPazė aktyvinanti
MAP kinazes
RGD (*angl.* arginine – glycine – aspartic acid) – arginino, glicino – asparto rūgšties trumpinys
RNR – ribonukleorūgštis
RTK – receptorinė tirozino kinazė
SDS – natrio dodecilsulfatas
SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas
SHED (*angl.* stem cells from human exfoliated deciduous teeth) dantų masės kamieninės
ląstelės
Src (*angl.* sarcoma) – vertimas iš šio žodžio trumpinio
TMB – 3,3', 5,5' – tetrametilbenzidinas
TMB – 3,3',5,5' – tetrametilbenzidinas
Ti – titanas
Tris – tris (oksimetil) – aminometanas
UV – ultravioletinė šviesa
VEGF (*angl.* vascular endothelial growth factor) – kraujagyslių endotelio augimo faktorius
XTT (*angl.* The Cell Proliferation Kit) – ląstelių proliferacijos kompleksas

IVADAS

Dantų implantacija – vienas didžiausių pasiekimų šiuolaikinėje odontologijoje, suteikiantis galimybę dantų netekusiems žmonėms pilnai juos atkurti. Šiuo metu implantai pakankamai sėkmingai integruojami į kaulinį audinį, tačiau ilgalaikiai rezultatai yra nepakankami ir priklauso nuo minkštųjų audinių „žiedo“, susidarančio apie dantų implantą. Šiuo požiūriu tai silpnoji dantų implantų vieta. Neužtikrinus tinkamos implanto – minkštųjų audinių sąveikos apie implantą susidaro tarpai, lengviau patenka bakterijos. Ilgainiui apie implantą susidaro „kišenė“, skatinama kaulo rezorbcija. Visa tai slopina audinių regeneraciją ir gijimo procesą, o vystantis infekcijai išskyla ir implanto atmetimo pavojus. Be to, blogas implanto sukibimas su jį supančiais minkštaisiais audiniais lemia vieną iš dažniausiai implantaciją lydinčių komplikacijų – dantenų recesiją. Jos metu dantenos atsitraukia nuo danties, apnuoginamas danties kaklelis ir dalis šaknies. Šis reiškinys gali pasireikšti ir apie natūralius dantis, sergant periodontitu. Lietuvoje tai pakankamai aktuali problema, nes daugiau nei 90 proc. Lietuvos populiacijos serga periodontitu. Dantenų atsitraukimas didina riziką netekti danties arba implanto, sukelia estetiškas problemas.

Pagrindinė dantenų recesijos priežastis – nepakankamas implantą supančių minkštųjų ir kietųjų audinių prisitvirtinimas, kuris priklauso nuo medžiagų, iš kurių yra pagamintas implantas, jo biosuderinamumo, fizikocheminių, biocheminių, topografinių charakteristikų, nulemiančių ląstelių adheziją, proliferaciją, diferenciaciją. Literatūros duomenimis, organizme minkštųjų audinių adhezijos mechanizmas ant implantų ir natūralių dantų skiriasi, žinomos šių skirtumų priežastys. Tačiau kol kas nėra pasiūlyta patikimų būdų, galinčių pagerinti implantų ir minkštųjų audinių sąveiką. Todėl tvirtų jungčių minkštųjų audinių – implanto sąlyčio riboje susidarymas yra pagrindinė sąlyga, užtikrinanti implantacijos sėkmę. Tačiau, kol kas nėra pasiūlyta metodikų, galinčių patikimai sujungti implantus ir juos supančius minkštuosius audinius.

Titanas – viena populiariausių dantų implantacijoje naudojamų medžiagų, pasižyminčių geru biosuderinamumu. Kadangi paviršiaus topografija/šiurkštumas yra viena iš pagrindinių ląstelių adhezijos stiprumą nulemiančių veiksnių, todėl pastaruoju metu aktyviai ieškoma būdų, galinčių pagerinti šio dantų implantacijoje naudojamo metalo bei aplinkinių burnos audinių – tiek minkštųjų, tiek ir kaulinio, sąveiką. Tiriami įvairūs fizikiniai, cheminiai paviršiaus šiukštinimo būdai, ant implantų paviršiaus imobilizuojamos įvairios biologiškai aktyvios molekulės, analizuojama jų įtaka ląstelių adhezijai, proliferacijai, diferenciacijai.

Pateikiamo gynimui darbo tikslas: įvertinti skirtingų titano implantų paviršiaus modifikavimo strategijų poveikį dantenų fibroblastų savybėms – adhezijai, proliferacijai ir diferenciacijai.

Uždaviniai:

- Gauti ir charakterizuoti pirminių dantenų fibroblastų liniją;
- Įvertinti dantenų fibroblastų adheziją ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršiaus;
- Palyginti skirtingos topografijos paviršių poveikį ląstelių proliferacijos intensyvumui;
- Ištirti signalinių molekulių – FAK ir Akt, raišką/aktyvinimą dantenų fibroblastų ląstelėse;
- Įvertinti gautos pirminės ląstelių linijos osteogeninį potencialą.

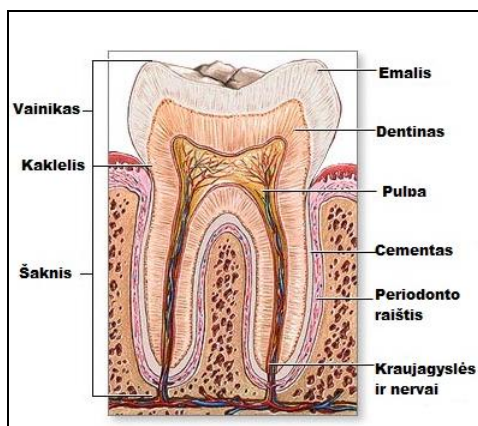
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Dantis supančių audinių sąveika su dantų implantais

Sėkmingą dantų implantaciją užtikrina kokybiškas ir ilgalaikis dantų implantus supančių kietųjų ir minkštųjų audinių prisitvirtinimas. Šiam prisitvirtinimui svarbu ne tik medžiagos, iš kurios pagamintas implantas, prigimtis, bet ir jo paviršiaus fizikinės, cheminės, biocheminės bei topografinės charakteristikos, nulemiančios kraujo ir audiniams specifinių baltymų adsorbciją implantų paviršiuje, jų konformacinius pokyčius, ląstelių adheziją ir vėlesnį jų atsaką. Be to, dantų implantacijos pasekoje dažnai vystosi dantenų atsitraukimas – recesija. Šis reiškinys yra būdingas ir natūraliems dantims.

1.1.1. Periodontitas, jo priežastys ir pasekmės

Periodonto raištį arba priedančio audinius sudaro jungiamasis audinys, supantis dantį, įtvirtinantis jį alveoliniame kaule ir aprūpinantis krauju. Priedančio audinius sudaro dantenos, raiščiai, laikantys dantį kaulinėje duobelėje, danties šaknies cementas ir alveolinis kaulas (1 pav.). Dantenos sudaro jungiamasis epitelis (4 %), burnos epitelis (27 %), jungiamasis audinys (69 %), kuriame yra ląstelių (makrofagų, limfocitų ir kt.), dalyvaujančių uždegiminiame atsake. Šios ląstelės sudaro (3 – 6 %) dantenų tūrio (Schroeder ir kt., 1973; Nyashin ir Nayshin, 2000).

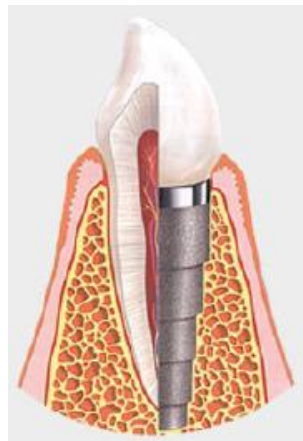


1 pav. Priedančio audiniai ir pagrindinės danties dalys (<http://www.shands.org/health/In-depth%20Reports/10/000024.htm>)

Periodontitas – lėtinė infekcinė liga (parodontozė), pažeidžianti periodonto audinius (Nair, 2006). O tai yra pagrindinė dantų netekimo priežastis. Paprastai periodontitas vystosi lėtai ir neskausmingai, ilgą laiką. Liga prasideda paviršiniu dantenų uždegimu – gingivitu, kurį sukelia bakterijos, gyvenančios ir besidauginančios burnos apnašose, susidarančiose iš maisto

likučių, dantų epitelio ląstelių. Nenuvalytos minkštos apnašos kaupiasi tarp dantų, po dantenomis, formuojasi “dantų akmenys”, kurie spaudžia dantenas, tirpdo kaulą ir suformuoja vadinamąsias “kišenes”. Dantenos pradeda kraujuoti, paburksta, pakeičia spalvą, atsitraukia nuo danties. Dėl to apsinuogina danties kaklelis, o vėliau ir šaknis. Ligos vystymąsi skatina ir žmogaus vietinio arba bendro organizmo imuniteto susilpnėjimas (Rybakov ir kt., 1975). Pastebėta, kad periodontitas dažniau vystosi žmonėms, kurie skundžiasi vidaus organų – skrandžio, kepenų, širdies veiklos sutrikimais. Esama nuomonių, kad periodontitas sietinas su kraujagyslių, endokrininės ir nervų sistemų ligomis, paveldimumu, netinkama mityba, seilių sudėties ypatumais, rūkymu. Periodontitas paprastai paūmėja sergant gripu, angina, skrandžio bei žarnyno ir kitomis infekcijomis (Lobregt ir kt., 2001).

Netekus dantų ir jų neprotezuojant didesnis krūvis tenka likusiems dantims. Tai irgi gali paskatinti periodontito vystymąsi. O nuryjamas nepakankamai gerai sukramtytas maistas apsunkina skrandžio bei kitų vidaus organų darbą. Šiuo metu dėl periodontito prarasti dantys dažniausiai pakeičiami dantų implantais (2 pav.).



2 pav. Prarasto danties pakeitimas implantu (Probst, 2009)

Tai yra dantų šaknų protezai (dirbtinės šaknys), skirti tvirtinti nenuimamiems dantų protezams (tiltams, vainikėliams) arba pagerinti išimamų protezų plokštelių laikymą. Dažniausiai tai titaninis ar porcelianis sraigtas įsukamas į viršutinio ar apatinio žandikaulio kaulą, atkuriantis natūralią danties šaknį. Dauguma šiuo metu naudojamų implantų yra sudaryti iš paties implanto kūno ir prisukamos atraminės galvos bei kitų protezavimo dalių. Implantui prigijus kaule, protezuojama – padaromas danties vainikėlis, tiltas arba fiksuojamas protezas. Implantai vidutiniškai tarnauja nuo 7 iki 15 metų (Jhaveri ir kt., 2009).

1.1.2. Minkštųjų audinių sąveika su implantu

Dantų implantacijos metu implanto paviršius sąveikauja su jį supančiais minkštaisiais audiniais. Skirtingai nei apie natūralius dantis, dantų implantus supantys minkštieji audiniai yra sudaryti iš jungiamojo audinio ir vienos rūšies epitelio. Šis epitelis vadinamas barjeriniu ir yra panašus į jungiamąjį epitelį, supantį natūralius dantis, tačiau jo citokeratinų raiška skiriasi (Moon ir kt., 1999; Marchetti ir kt., 2002; Mackenzie ir Tonetti, 1995). Vėlesni tyrimai atskleidė ir funkcinis bei fenotipo skirtumus tarp natūralius dantis supančio jungiamojo ir implantus supančio barjerinio epitelio. Natūralius dantis supančio epitelio ląstelės gali sudaryti hemidesmosomas, yra išlaikios proliferacijos ir diferenciacijos galimybes, bei gali formuoti imuninį atsaką (Fujiseki ir kt., 2003). Į alveolinį kaulą įsriegus titaninį implantą, vystosi uždegiminis atsakas, nes kietieji ir minkštieji audiniai sriegimo metu yra destabilizuojami. Kadangi nesusidaro hemidesmosomos, atsiranda tarpai tarp implanto ir jį supančių minkštųjų audinių, lengviau patenka bakterijos (Jansen ir kt., 1985). To pasekoje, apie implantą susidaro „kišenė“, skatinama kaulo rezorbcija (Bauman ir kt., 1993; Andersson ir kt., 1995; 1998). Tokiu būdu slopinama audinių regeneracija ir gijimas, o vystantis infekcijai išskyla implanto atmetimo pavojus. Be to, blogas implanto sukibimas su minkštaisiais audiniais po dantų implantacijos dažnai lemia dantenų recesijos vystimąsi. Jos metu dantenos atsitraukia nuo danties, apnuogindamos danties kaklelį ir dalį šaknies.

Taigi, tvirtų jungčių minkštųjų audinių – implanto sąlyčio riboje susidarymas yra pagrindinė sąlyga, lemianti implantacijos sėkmę. Tačiau, kol kas nėra pasiūlyta metodikų, galinčių patikimai sujungti implantus ir juos supančius minkštuosius audinius.

1.1.3. Implantų paviršiaus modifikavimo strategijos

Siekiant pagerinti ląstelių adheziją bei sumažinti uždegiminį atsaką, titaniniai implanto paviršiai gali būti modifikuojami: paviršius dengiamas įvairiais fermentais, augimo veiksniais (BMP – 2, TGF – β , IGF ir kt.), tarpląstelinio užpildo komponentais, fizikiniais ir cheminiais metodais keičiant paviršiaus topografiją (Jonge ir kt., 2008). Nustatyta, kad TiO_2 (titano oksidas) paviršiaus modifikavimas gali skatinti Ca – P susidarymą, tokiu būdu palengvindamas implanto osteointegraciją. Parodyta, kad titano paviršiaus dengimas TiN (titano nitridu) teigiamai veikia audinio adheziją ant implanto paviršiaus, o ant titaninių implantų paviršių suformuota plona oksido plėvelė padeda integruoti implantą į kaulinį audinį, gerina kraujagyslių susidarymą, adheziją bei mažina bakterijų sukeltas infekcijas (Groessner – Schreiber ir kt., 2003).

Neigiamo krūvio titano paviršiui suteikimas ar bioaktyvių molekulių prijungimas gali pagerinti minkštųjų audinių prisitvirtinimą prie implanto paviršiaus (Peltola ir kt., 2000; Rossi ir kt., 2007). Ląstelių adhezija ant titano paviršių stiprėja juos padengiant biologiškai aktyviomis tarpląstelinio užpildo molekulėmis. Pavyzdžiui, paviršius padengus integrinais, pagerėja ląstelių adsorbcija, nes šie baltymai yra vieni pagrindinių komponentų, užtikrinančių ląstelės sąveiką su substratu (Jonge ir kt., 2008; Demarco ir kt., 2011). Fibroblastų, kurie gamina daugelį esminių jungiamojo audinio komponentų, adhezijos stiprinimas ir kolageno pluoštų įterpimas taip pat padidina implanto biologinį suderinamumą. Todėl geresnė fibroblastų adhezija ant implanto turėtų sudaryti palankias sąlygas implanto integracijai į minkštuosius jungiamuosius audinius (Baxter ir kt., 2002).

Žinoma, kad suaktyvinus signalo perdavime dalyvaujančias molekules (FAK (fokalinės adhezijos kinazės ((arba PTK2), – *angl.* focal adhesion kinase, toliau tekste: FAK) /Src (*angl.* sarcoma, vertimas iš šio žodžio trumpinio, toliau tekste: Src) pagerėja ląstelių tarpusavio sąveika bei jų adhezija ant titano paviršiaus (Suk – Won ir kt., 2009).

Ląstelių sąveiką su implanto paviršiumi pagerina ir adheziją sustiprina paviršiaus dengimas sintetiniais peptidais: (i) arginino – glicino – aspartato (*angl.* arginine – glycine – aspartic acid, arginino, glicino – asparto rūgšties trumpinys, toliau tekste: RGD) seka, būdinga tarpląstelinio užpildo molekulėms – fibronektinui, osteopontinui, lamininui, vitronectinui, kai kuriems kolagenams, tenascinui; (ii) YIGSR – lamininui būdinga seka; (iii) kitos sekomis – RGDS, LDV, KQAGDV, VAPG (Nebe ir kt., 2007). Nustatyta, RGD motyvai ypatingai svabūs žmogaus dantenų fibroblastų bei tarpląstelinės medžiagos sukibimui anstyvajame etape po implantacijos. Atsiradęs ryšys tarp RGD ir tarpmembraninių baltymų skatina citoskeleto reorganizaciją, o tai turi įtakos ir minkštųjų audinių sąveikai su implantu (Zhao ir kt., 2006; Pae ir kt., 2009).

Daug efektyvesni implantai, kurių paviršius yra modifikuotas naudojant dvigubą dengimą: biologiškai aktyviu mineralu Ca – P ir kolagenu. Toks padengimas skatina aktyvios kaulo dalies regeneraciją ir ląstelių adheziją (Hamdan ir kt., 2006). Ant implanto imobilizuotos mineralinės medžiagos kartu su augimo veiksniais (BMP – 2, TGF – β , IGF ir kt.) skatina veiksmingesnį implanto įsitvirtinimą kaule. Augimo veiksniai yra atsakingi už ląstelių replikaciją, diferenciaciją, migraciją bei baltymų sintezę ląstelėje. Jie jungiasi su tiksliniais ląstelės receptoriais, skatindami signalo perdavimą, kurio pasėkmė – biologinis atsakas. Kartu su mineralinėmis medžiagomis, augimo veiksniai išlaiko stabilumą, ilgėja jų biologinio aktyvumo laikas (Groessner – Schreiber ir kt., 2003).

Implanto paviršiaus pakeitimas/modifikavimas turi įtakos ir pačioms ląstelėms: kinta ląstelių forma, stiprėja tarpląstelinė sąveika bei ląstelių sąveika su implantu, intensyvėja ląstelių proliferacija, aktyvinama tam tikrų genų raiška (Suk – Won ir kt., 2009).

1.2. Kamieninės ląstelės ir jų naudojimas odontologijoje

Kamieninės ląstelės – tai nespecializuotos ląstelės, pasižyminčios neribotu proliferaciniu potencialu, gebančios diferencijuotis į įvairių tipų audinių ląsteles. Šias ląsteles 1960 m. pirmieji aprašė Ernestas A. McCullochas ir Jame E. Tillas (Siminovitch ir kt., 1963).

Pagal kilmės šaltinį išskiriamos **embrioninės** ir **suaugusio žmogaus kamieninės ląstelės**. **Embrioninės kamieninės ląstelės** gaunamos iš 3 – 5 dienų amžiaus embriono – tai vidinės blastocistos ląstelės. Šios ląstelės gali diferencijuotis į visų tipų ląsteles, tačiau jų išgavimas susijęs su etinėmis problemomis. Tai pagrindinė ir svarbiausia problema, su kuria susiduria mokslininkai norėdami jas tyrinėti. Todėl pagrindinis dėmesys skiriamas **suaugusio žmogaus kamieninėms ląstelėms**, kurios išskiriamos iš įvairių subrendusio organizmo išsivysčiusių audinių (kaulų čiulpų, raumenų, danties audinių ir kt.) (Elliott ir Elliott, 2009). Įvairūs tyrimai ir bandymai odontologijos srityje yra susiję būtent su suaugusio organizmo kamieninėmis ląstelėmis, nes tai nekelia etinių problemų, nesudėtingas ląstelių išskyrimas, ląstelėms būdinga proliferacija ir diferenciacija (Morscheck ir kt., 2008).

Skirtingų audinių kamieninės ląstelės pasižymi nevienodu gebėjimu diferencijuotis į įvairius ląstelių tipus. Šios ląstelės diferencijuojasi įvairiomis kryptimis veikiant vidiniams ir išoriniams signalams. **Vidinius signalus** kontroliuoja ląstelės genai, turintys instrukcijas visoms jos struktūroms ir funkcijoms. **Išoriniai signalai** – tai cheminės medžiagos, kurias sekretuoja kitos ląstelės, fiziniai kontaktai su kaimyninėmis ląstelėmis ir tam tikros molekulės mikroaplinkoje (Paratore ir kt., 2006; Ho ir kt., 2006).

1.2.1. Suaugusio organizmo kamieninės ląstelės

Suaugusio organizmo kamieninės ląstelės randamos visame organizme. Įvairių tipų audiniuose jos sudaro labai nedidelę specializuoto audinio ląstelių populiacijos dalį. Suaugusiame organizme kamieninės ląstelės užtikrina nuolatinį trumpai gyvenančių kraujo, odos, spermos ląstelių pakeitimą naujomis, palaiko audinių bei viso organizmo stabilumą ir pastovią būklę – homeostazę. Suaugusio žmogaus audiniuose esančios kamieninės ląstelės yra natūrali audinių regeneracinės sistemos dalis. Gavusios signalą, kurį sukelia bet koks audinių pažeidimas, šios ląstelės pradeda dalintis: viena iš dukterinių ląstelių išlieka kamienine, o kita virsta specializuota. Jos diferencijuojasi, tampa pažeisto audinio ląstelėmis ir taip atkuria sutrikusią organizmo pusiausvyrą (Kuroda ir kt., 2010; Locke ir kt., 2009).

Audinių gijimą skatina ir kamieninių ląstelių išskiriamos biologiškai aktyvios medžiagos. Kai audinyje esančios kamieninės ląstelės išsenka, į jį papildomai siunčiamos ypatingos kamieninės kaulų čiulpų ląstelės. Tačiau jų kaulų čiulpuose yra labai nedaug – nuo 0,001 % iki 0,01 % ir, esant rimtiems pažeidimams, organizmui jų tiesiog nepakanka (Zuk, 2010). Deja, šios ląstelės sensta kartu su žmogumi ir, metams bėgant, netenka savo gyvybingumo. Be to, kamienines ląsteles per jų gyvavimo laikotarpį veikia įvairūs toksinai ir aplinkos veiksniai, galintys sukelti genetines mutacijas. Visa tai lemia vėlesnį jų atsinaujinimą, diferenciaciją, proliferaciją. Spėjama, kad kamieninės ląstelės organizme gali likti nediferencijavusios dar nuo embriono stadijos. Šio tipo kamieninių ląstelių daugiausiai randama vaikų organizme. Suaugusio individo organizme jų aptinkama mažiau (Shultz, 1996).

1.2.2. Burnos audinių kamieninės ląstelės

Pirmieji tyrimai su burnos ląstelėmis pradėti 1980 m. Parodyta, kad odontoblastai gali diferencijuotis į dantų pulpos ląsteles, kurios gali dalyvauti dantino regeneracijoje (Shuttleworth ir kt., 1980).

2000 m. iš dantų masės, iškritus pieniniams dantims, buvo išskirtos kamieninės ląstelės. Pieninių dantų pakeitimas nuolatiniais yra dinamiškas procesas, susiejantis pieninių dantų šaknų rezorbciją ir nuolatinių dantų išaugimą. Po pieninių dantų iškritimo likusiose dantų karūnelėse – pieninių dantų akytosios medžiagos dalyje, aptinkama dantų masės kamieninių ląstelių (*angl.* stem cells from human exfoliated deciduous teeth, toliau tekste: SHED). Bandymuose *in vivo*, net 67 % išskirtų dantų masės kamieninių ląstelių parodė didelį odontogeninį potencialą. Tyrimuose parodyta, kad šios rūšies kamieninės ląstelės taip pat geba diferencijuotis į adipogenines, miogenines bei nervinio audinio ląsteles (Casagrande ir kt., 2011; Duailibi ir kt., 2012). SHED nišos daugiausiai lokalizuotos perivaskuliarinėje pulpos ertmėje. Iš šios nišos išskirtos kamieninės ląstelės įsodintos į peles, formavo į dentiną panašią struktūrą (McGuire ir Nunn, 2005; Silverio ir kt., 2008). Kitais duomenimis, SHED ląstelės pasižymi ne tik galimybe diferencijuotis į dentiną, bet ir į pulpos ląsteles (He ir kt., 2010; Silverio ir kt., 2008). Nustatyta, kad dantų masės kamieninės ląstelės pasižymi didesniu proliferaciniu aktyvumu, negu kamieninės ląstelės išskirtos iš kaulo ar periodonto pluošto. Ši jų savybė bei prieinamumas (paprastas išskyrimas) lemia didelį panaudojimo potencialą regeneracinėje medicinoje (Yan ir kt., 2011).

Kitas kamieninių ląstelių šaltinis burnoje – dantenos. Dantenų kamieninės ląstelės yra priskiriamos prie mezenchiminės kilmės kamieninių ląstelių (*angl.* gingival tissue – derived mesenchymal stem cells, tekste: GT – MSC). Nors kol kas didžiausias mezenchiminių kamieninių ląstelių šaltinis yra kaulų čiulpai, tačiau vis daugiau dėmesio klinikinėje praktikoje

kreipiama į GT – MSC. Šios ląstelės turi nemažai privalumų lyginant su kaulų čiulpų kamieninėmis ląstelėmis. Pirmiausia ir svarbiausia tai, kad ląstelių išskyrimui reikia mažo kiekio audinio, jį patogų paimti (mažai invazinė procedūra), nelieta rando, o biopsijos paėmimas – neskausminga procedūra, nes dantenų audinyje gausu kraujagyslių, todėl jam būdingas sugebėjimas atsinaujinti *in vivo*. Ląstelės intensyviau dauginasi (nereikalingi papildomi augimo veiksniai), suformuoja pirminę kultūrą per trumpą laiką (vienodai homogeniška populiacija, todėl dauginimosi metu išlaikomi kamieninių ląstelių žymenys), išlaiko stabilų fenotipą ir morfologiją viso dauginimosi metu (verpstės forma). Ilgalaikėse GT – MSC kultūrose palaikoma telomerazės veikla, išlaikomas stabilus kariotipas. Audinių regeneracijos tyrimuose *in vivo* ir *in vitro* įrodyta, kad GT – MSC pasižymi multipotentine diferenciacija. Būtent dėl šių visų privalumų, GT – MSC yra patogus įrankis konstruojant bioaktyvius audinius, kuriant naujas audinių regeneracijos technologijas (Tomar ir kt., 2010).

Bene didžiausias ląstelių kamieniško potencialas glūdi dantenų folikulo kamieninėse ląstelėse (*angl.* stem cells from the dental follicle, toliau tekste: DFSC). DFSC gali diferencijuotis į osteoblastus, cementoblastus, fibroblastus, adipocitus, neuronų ląsteles, bei formuoja periodonto raiščio ląsteles. DFSC daugiausiai lokalizuojasi krūminiuose dantyse. Daugiausia šių ląstelių yra jauname, iki 16 – tų, žmogaus organizme. Vėliau jų kiekis mažėja, todėl plačiau tyrimai su šiomis ląstelėmis nėra atliekami (Oswal ir kt., 2011).

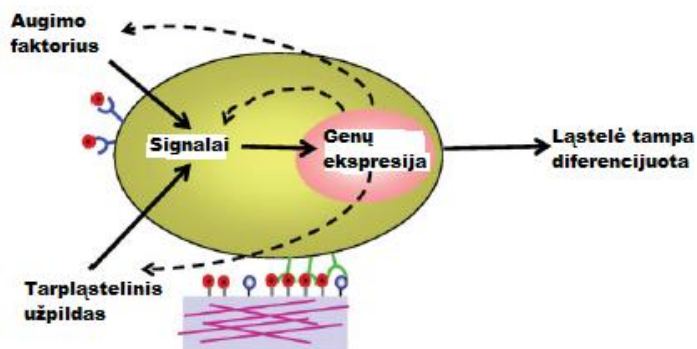
Jau 1985m. Melcher nustatė, kad periodonto raiščio kamieninės ląstelės (*angl.* periodontal ligament stem cells, toliau tekste: PDLSC) pasižymi dideliu potencialu periodonto gydyme (Melcher, 1985). Šios kamieninės ląstelės vystosi iš dantenų folikulo kamieninių ląstelių embriogenezės metu. PDLSC, reaguodamos į pažeidimą, gali migruoti ir diferencijuotis į reikiamą ląstelių tipą. Nustatyta, kad jos gali diferencijuotis į osteoblastus, cementoblastus, fibroblastus (Egusa ir kt., 2010). Periodonto raiščio kamieninės ląstelės skatina mineralizuoto ir kaulinio audinio formavimąsi: tyrimuose *in vivo* PDLSC formavo kolageno pluošto ir periodonto raiščio struktūras, dalyvavo cemento gamyboje. Taigi, jos gali būti patikimas šaltinis periodonto audinių rekonstrukcijoje (Bluteau ir kt., 2008; Yen ir Sharpe, 2008).

Be periodonto raiščio kamieninių ląstelių odontologijoje gali būti naudojamos kaulo kamieninės ląstelės, embriono kamieninės ląstelės, riebalų kamieninės ląstelės (*angl.* adipose stem cells, toliau tekste: ASC). Visos jos geba diferencijuotis į osteoblastus, cementoblastus, fibroblastus, formuoja į kolageną panašius pluoštus. Kamienines ląsteles transplantavus į periodonto defektų vietas skatinama jo regeneracija (Abe ir kt., 2011). Tyrimais parodyta, kad efektyviausias ASC pritaikymas odontologijoje būtų, jas auginant kartu su dantenų epitelio kamieninėmis ląstelėmis, nes dantenų ląstelės išskirdamos į terpę įvairias bioaktyvias molekules skatina ta pačia kryptimi diferencijuotis ir ASC ląsteles. Tiriant šių ląstelių morfologiją

nustatyta, kad naujos dantenų epitelio ląstelės turėjo tuos pačius paviršiaus žymenis, kaip ir senesnės dantenų epitelio kamieninės ląstelės (Hu ir kt., 2006).

1.2.3. Kamieninių ląstelių diferenciacijos galimybės

Kamieninių ląstelių diferenciacija išsiaiškinta apie 2000 m., kai mokslininkai įrodė, kad iš suaugusios pelės audinių galima išskirti ląsteles, kurios gali duoti pradžią skirtingų organizmo audinių tipų ląstelėms, pavyzdžiui, kaulų čiulpų ląstelės gali išsivystyti į nervų ar kepenų ląsteles ir pan. (Wulf ir kt., 2001). Šie tyrimai parodė, kad galima kamieninių ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos manipuliacija, tačiau suaugusio organizmo kamieninių ląstelių diferenciacijos galimybės ribotos. Skirtingų audinių kamieninės ląstelės pasižymi nevienodu gebėjimu diferencijuotis į įvairius ląstelių tipus. Šios ląstelės diferencijuojasi įvairiomis kryptimis veikiant vidiniams ir išoriniams signalams. Vidinius signalus kontroliuoja ląstelės genai, turintys instrukcijas visoms jos struktūroms ir funkcijoms. Išoriniai signalai – tai cheminės medžiagos, kurias sekretuoja kitos ląstelės, fiziniai kontaktai su kaimyninėmis ląstelėmis ir tam tikros molekulės mikroaplinkoje (Paratore ir kt., 2006; Ho ir kt., 2006) (3 pav.).

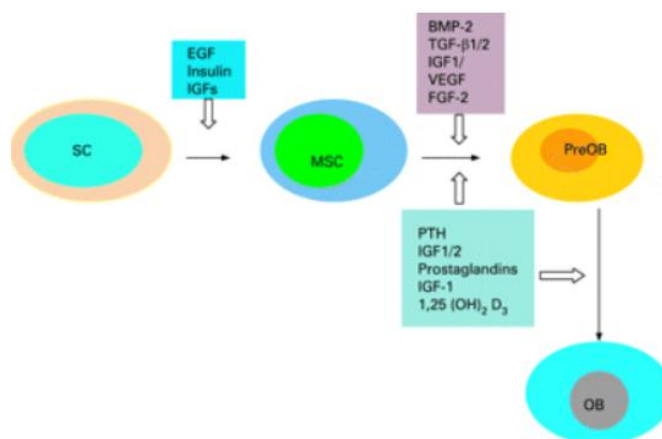


3 pav. Kamieninių ląstelių diferenciaciją reguliuojantys veiksniai (Platt ir kt., 2009)

Suaugusio organizmo audiniuose kamieninės ląstelės aptinkamos išsidėsčiusios tiek po vieną, tiek ir telkiniuose, savotiškose „nišose“, kur jas supa specifinė aplinka ir tokios pat kamieninės ląstelės. Tokių „nišų“ pavyzdžiais galima laikyti gemalines ląsteles, plauko maišelyje, kaulų čiulpuose, plonųjų žarnų gaurelių kriptose, smegenų specifinėse srityse aptinkamus kamieninių ląstelių telkinius. Tikėtina, kad šiuose telkiniuose esančių ląstelių likimą apsprendžia tiek jas supanti mikroaplinka, tiek ir už šios „nišos“ ribų esančios kaimyninės diferencijuotos ląstelės. „Nišoje“ ląsteles supanti aplinka palaiko jas nediferencijuotoje būsenoje, bet jei ląstelė iš jos išeina, ją pradeda veikti kaimyninės diferencijuotos ląstelės, kurios ją nukreipia diferenciacijos linkme. Kamieninių ląstelių pusiausvyrą tarp ramybės būsenos, save

palaikančio dalinimosi ir diferenciacijos proceso reguliuoja įvairūs ekstraląsteliniai veiksniai, inicijuojantys viduląstelinis signalinius kelius bei aktyvinantys tam tikrus būtinus transkripcijos faktorius. Manoma, kad ta pati diferencijuotų ląstelių ekstraląstelinė aplinka didele dalimi lemia kamieninių ląstelių buvimą „nišoje“. Taigi, šių ląstelių likimas priklauso nuo jų sugebėjimo reaguoti į išorinius ir vidinius signalus. Atsaką nulemia ir ląstelių buvimo vieta bei laikas. Kaimyninės diferencijuotos ląstelės sekretuoja specifinius veiksnius ir sukuria ekstraląstelinę aplinką, kuri leidžia kamieninėms ląstelėms „nišoje“ vykdyti arba „savęs – atgaminimo“ programą, arba pradėti diferenciacijos procesą (Fuchs ir kt., 2004). Dažnai tokiose „nišose“ ląstelės yra ramybės būsenoje, nesidaugina arba dauginasi labai lėtai. Aktyvią šių ląstelių proliferaciją dažniausiai aktyvina nauji veiksniai, atsiradę dėl tam tikrų audinio pažeidimų. Tačiau mechanizmai, lemiantys ramybės būsenoje esančių kamieninių ląstelių pažadinimą proliferacijai ar diferenciacijai nėra pilnai ištirti. Dar nėra pakankamai žinoma ir tai, kaip kiekvieno dalinimosi metu kamieninė ląstelė „renkasi“ savo kelią – likti to paties diferenciacijos lygio ir atgaminti savo populiaciją ar pasukti diferenciacijos linkme. Tikėtina, kad ląstelių kamieniškumo palaikyme dalyvauja keli ląstelės signaliniai keliai, tarp kurių dažniausiai minimi Wnt, Notch, transformuojančio augimo faktoriaus β (TGF β), kaulų morfogeninio baltymo (BMP), leukozę inhibuojančio veiksnio (LIF) signalo perdavimo keliai. (Zhang ir kt., 2005).

Auginant ląsteles *in vitro* ir norint jų diferenciaciją nukreipti tam tikra linkme, naudojami įvairūs veiksniai, kurie aktyvindami tam tikrų genų rinkinius, transkripcijos faktorius priverčia ląstelę diferencijuotis (4 pav.).



4 pav. Kamieninės ląstelės diferenciacija osteogenine linkme. Čia: SC – kamieninė ląstelė; MSC – mezenchiminė kamieninė ląstelė; PreOB – pirmykštis osteoblastas; OB – pilnai diferencijuotas osteoblastas. Kvadratuose išvardinti augimo veiksniai, skatinantys ląstelių diferenciaciją (Datta ir kt., 2008)

Pavyzdžiui, epiderminis augimo veiksnys (toliau tekste: EGF) aktyvina osteogeninę mezenchiminių kamieninių ląstelių diferenciaciją. Trombocitų kilmės augimo veiksnys (toliau

tekste: PDGF) taip pat gali skatinti šių ląstelių osteogeninę diferenciaciją, tačiau šiuo atveju turi būti nuslopinamas PI – 3 kinazės signalinis kelias (Datta ir kt., 2008).

1.3. Ląstelių žūties būdai – apoptozė ir nekrozė

Išskiriami du pagrindiniai ląstelių žūties būdai – nekrozė ir apoptozė. Nekrozė ilgai buvo vienintelis žinomas ląstelės mirties būdas, pasireiškiantis ryškiais ląstelių homeostazės sutrikimais (prarandama jonų transporto kontrolė), ląstelių organoidų brinkimu (dėl vandens ir ekstraląstelinio jonų difuzijos į ląstelės vidų), žūtimi plystant plazminei bei organoidų membranoms, ir išsiliejant ląstelių organoidų turiniui. Degradaciniai ląstelės fermentai, išėję iš membranų apsupties, patenka į tarpląstelinį užpildą sukelia uždegiminį atsaką audiniuose, pažeidžia gretimas ląsteles, kurios dėl to taip pat dažniausiai žūva. Taigi, nekrozės metu ląstelės žūva grupėmis, sukeldamos imuninės sistemos uždegiminį atsaką, kuriam pasibaigus, likusi nefunkcionalus audinio dalis palaipsniui pakeičiama naujomis ląstelėmis ar jungiamojo audinio randu, jei nekrozė įvyko nesiregeneruojančiame audinyje. Pastaruoju atveju nekrozė visada negrįžtamai pakeičia tiek audinio, tiek organo, tiek ir viso organizmo savybes, ypač jei ji įvyksta gyvybiškai svarbias funkcijas atliekančiuose audiniuose, pavyzdžiui, nerviniame audinyje ar miokarde (Kumar 1998; Lodish ir kt., 2000).

Terminą “apoptozė”, apibrėžiantį kitokią, nei nekrozė ląstelės mirtį, 1972 m. pavartojo mokslininkai Kerris, Wyllie ir Currie, apibendrindami savo pastebėjimus tiriant įvairių tipų ląsteles. Jie aprašė morfologinius pokyčius, kurie gerokai skyrėsi nuo nekrozei būdingų reiškinių: ląstelės – traukiasi, taip pat traukiasi ir jų organoidai – mitochondrijos, branduolys, kondensuojasi branduolio chromatinas, vėliau branduolys fragmentuojasi, o ląstelė pasidalina į mažas plazminės membranos apsuptas dalis, vadinamas apoptoziniais kūneliais. Jų membrana intaktinė, o viduje pasiskirsto nesuirę organoidai bei branduolio fragmentai (Kerr ir kt., 1972). Apoptozinius kūnelius fagocituoja makrofagai ar kaimyninės ląstelės. Tokia ląstelės mirtis nesukelia uždegimo, jos pasekmės audiniui yra žymiai palankesnės negu nekrozės. Trumpiau tariant, apoptozę galima apibrėžti kaip ląstelės žūties formą, kurios funkcija – nepageidaujamų bei pažeistų ląstelių pašalinimas iš organizmo, aktyvuojant iš anksto užprogramuotą, šiai formai būdingų genų sintezę.

Apoptozės eiga skirstoma į **dvi fazes**:

I. Aktyvacijos fazėje ląstelės morfologija nekinta, tačiau veikia aktyvaciniai apoptozės mechanizmai. Šios fazės trukmė įvairių populiacijų ląstelėse skiriasi ir trunka nuo kelių minučių iki kelių dienų. Šioje fazėje apoptozę galima sustabdyti.

II. Egzekucijos fazės trukmė (15 min. – 1 val.) ir mechanizmas visoms ląstelėms vienodas. Šioje fazėje pradeda veikti “mirties molekulės”, prasideda negrįžtamų pokyčių grandinė, kurios metu greitai išryškėja morfologiniai pokyčiai. Vieni pagrindinių apoptozės vykdytojų yra savitosios citoplazminės proteazės, priklausančios kaspazių šeimai. Kaspazių aktyvumo pasekmė yra dauguma morfologinių apoptozės požymių, o tai laikoma savitu apopozės požymiu (Franklin ir McCubrey, 2000; Alberts ir kt., 2002).

Apoptozei vykti reikalinga energija, kuri naudojama daugeliui apoptozės metu vykstančių reakcijų – ląstelės griaučių degradacijai, kai kurių apoptozei specifinių proteazių – kaspazių – aktyvacijai, ligandų, kuriuos atpažįsta fagocituojančių ląstelių receptoriai, ekspresijai į ląstelės membranos išorę ir kitoms reakcijoms įvykdyti. Taigi apoptozė yra tvarkinga, reguliuojama, energijos reikalaujanti, sudėtinga reakcijų seka, kurios galutinis rezultatas – pavienių pažeistų ar kitaip audiniui kenksmingų ar nenaudingų ląstelių sunaikinimas, nepakenkiant sveikoms audinio ląstelėms. Šiuo požiūriu nekrozės rezultatas yra visiškai priešingas, nes ląstelės žūva grupėmis ir tuomet pažeidžiama didesnė ar mažesnė audinio dalis (Majno ir Joris, 1995; Enari ir kt., 1998).

Apoptozės ir nekrozės morfologiniai skirtumai apibendrinti 1 lentelėje.

1 lentelė. Morfologiniai apoptozės ir nekrozės skirtumai (Mildažienė ir kt., 2004):

Morfologijos bruožas	Apoptozė	Nekrozė
Ląstelės dydis	Sumažėja	Padidėja
Ląstelės membranos pralaidumas	Normalus	Ankstyvas
Ląstelių atsiskyrimas	Ankstyvas, ląstelės žūva pavieniui	Vėlyvas, ląstelės žūva grupėmis
Membranos “pumpuravimasis”	Ankstyvas bruožas	Nebūdingas
Mitochondrijos	Normalios	Išbrinkusios, suplokštėjusiom kristom
Branduolio chromatinas	Kondensuotas, fragmentiškas	Nekondensuotas
Apoptoziniai kūnai	Būdingi	Nebūdingi
Ląstelių likimas	Fagocitozė	Lizė
Aptikimas audinių pjūviuose	Sunkiai pastebimas	Akivaizdus

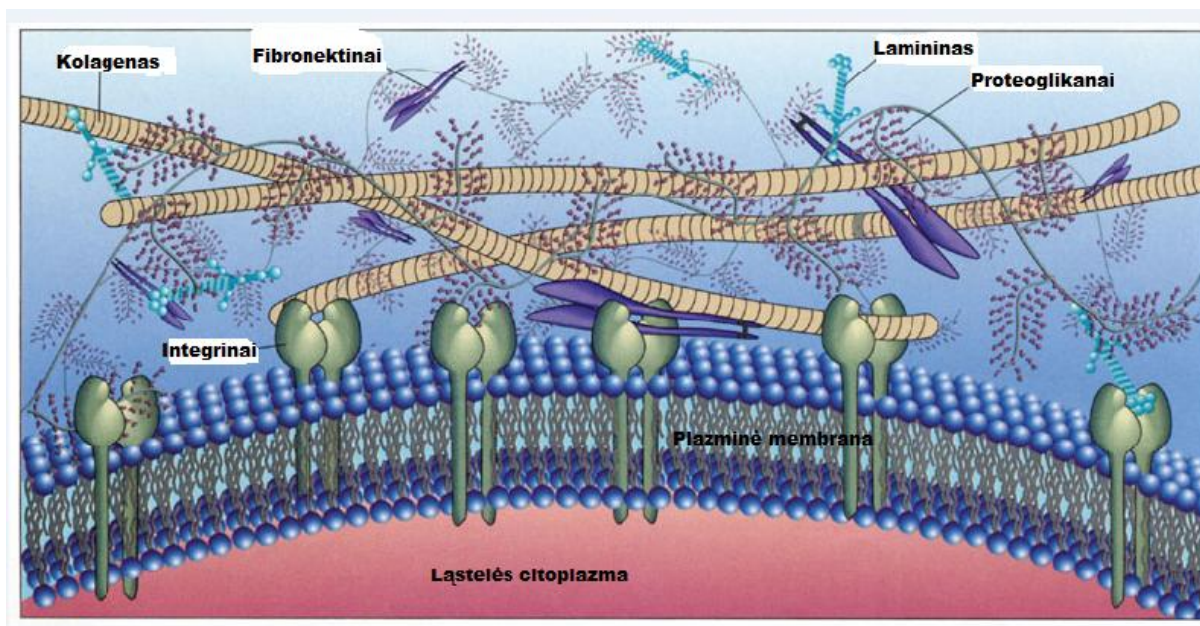
Apoptozė ir nekrozė tame pačiame audinyje gali vykti vienu metu. Kai kurie įvykiai apoptozės ir nekrozės eigoje yra bendri – proceso “paleidimas”, kai kurie signaliniai mechanizmai (Ca^{2+}), jutikliai (mitochondrijos), netgi kai kurios kaspazės dalyvauja ir nekrozėje, ir apoptozėje. Nekrozė gali būti laikoma nutrauktos apoptozės rezultatu. Ląstelės mirtį kontroliuojančių veiksnių aktyvacijai ir organizuotos mirties (apoptozės) įvykdymui būtinos tam tikros metabolinės sąlygos. Svarbiausia jų – ląstelėje esančių energijos rezervų kiekis. Apoptozė nevyksta trūkstant energijos (Cooper, 2000).

1.4. Tarpląstelinis užpildas

Tarpląstelinis užpildas (*angl.* extracellular matrix, toliau tekste: EM) yra specializuota struktūra, už ląstelės plazminės membranos esantis organizuotas darinys, aptinkamas tarp daugialąsčių organizmų ląstelių ir audinių. Skirtingų audinių ir organizmų EM skiriasi, tačiau jį sudaro panašios medžiagos – vanduo, mineralinės druskos, įvairių baltymų ir angliavandenių mišinys (5 pav.). EM suteikia specializuotiems audiniams išskirtines savybes. Pavyzdžiui, kaulų ir dantų emalio užpildas turi daug mineralinių medžiagų, padedančių atlaikyti didelį spaudimą.

Skirtingų audinių EM – skirtingas, bet tam tikras sudedamasis dalis turi visų audinių EM, t.y.:

- glikoproteinai: kolagenas, fibronektinas, lamininas, elastinas, nidogenas;
- glikozaminoglikanai (toliau tekste: GAG) – rūgštiniai polisacharidų dariniai;
- proteoglikanai – baltymai su kovalentiniu ryšiu prijungtais GAG: perlekanas, dekorinas, agrekanas (Hay, 1991; Geiger ir kt., 2001).



5 pav. Tarpląstelinio užpildo ir ląstelės sąveika (http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2/textbook/extracellmatrix.html)

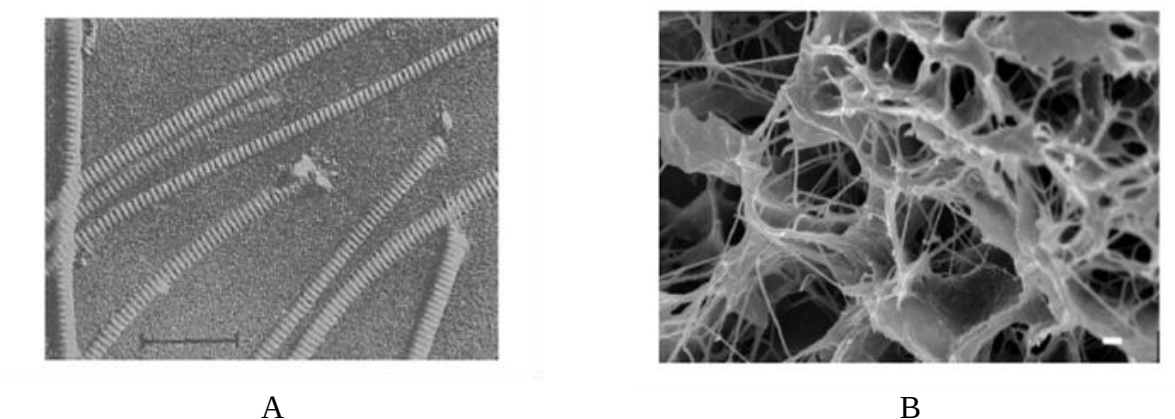
Pagrindinės EM molekulės yra glikoproteinai ir proteoglikanai.

Proteoglikanai – baltymai, turintys ilgų, nešakotų GAG, prijungtų prie serino (dažniausiai) hidroksido (toliau tekste: OH) grupės, kai baltymas palieka endoplazminį tinklą.

Glikoproteinams būdingi trumpi, šakoti oligosacharidai, prijungti prie asparagino amino grupės. Greta jų gali būti ir oligosacharidų, prijungtų prie serino OH grupės. Glikoproteinai kartu su glikolipidais ir proteoglikanais ląstelės išorėje sudaro vientisą sluoksnį,

vardinamą glikokaliksą, kuris apsaugo ląstelę nuo mechaninio ir cheminio poveikio, be to, atskiria ląsteles vieną nuo kitos ar nuo kitų objektų (Lodish ir kt., 2000; Yates ir kt., 2011).

Kolagenai – siūlo formos glikoproteinai priklausantys fibrilinių baltymų šeimai, kurie aptinkami tik EM (6 pav., A). Šiuos baltymus gamina lygiųjų raumenų, epitelinės ląstelės, o daugiausia fibroblastai – ląstelės, aptinkamos įvairaus tipo jungiamuosiuose audiniuose. Būtent kolageno kiekis ir jo siūlų išsidėstymas įvairiuose audiniuose lemia kiekvieno konkretaus audinio mechanines savybes (6 pav., A ir B) (Cooper, 2000).



6 pav. Kolageno gijos ir skaidulos jungiamajame audinyje (<http://thegist.dermagist.com/wp-content/uploads/2011/01/collagen.jpg>; <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=8671>)

Šiuo metu yra žinoma 20 tipų kolagenų. Kolagenų tipas būdingas tam tikram audiniui, bet tas pats tarpląstelinis užpildas gali turėti dviejų ir daugiau tipų kolagenus. Nors jų struktūra yra skirtinga, visų tipų kolagenai turi bendrų ypatumų – jų sudėtyje yra daug glicino, prolino ir hidroksiprolino. Šios aminorūgštys sudaro kolagenui būdingą pasikartojantį motyvą Gly – Pro – X (X – gali būti įvairios aminorūgštys). Visi kolagenai yra trimeriniai baltymai, sudaryti iš savitos struktūros polipeptidinių grandinių, vadinamų α grandinėmis. Tam tikrų tipų (II, III, X) kolagenai yra homotrimerai, sudaryti iš trijų vienodų grandinių, kiti – heterotrimerai, sudaryti iš dvejų (I, IV tipų) ar trijų (V, VI, IX tipų) skirtingų α grandinių. Didžiąją dalį savo ilgio α grandinės yra persipynusios vienos su kitomis. Jos sudaro kolagenui būdingą trigubą spiralę. Didelė dalis kolagenų, tarp jų I, II, III tipų, vadinami gijiniais kolagenais, nes jie formuoja gijas, kurios susijungia į storesnius kolageno siūlus. Kolageno gijų tvirtumą papildomai didina sąsiuvos – aldoliniai ryšiai. Ne visi kolagenai sudaro gijas. Vienas iš negijinių kolagenų yra IV tipo kolagenas, randamas pamatinėje laminoje. IV tipo kolagenas joje sudaro dvimatį tinklą, tvirtinamą kitomis užpildo medžiagomis (3 pav., B) (Schultz ir Wysocki., 2009; Alberts ir kt., 2002).

Fibronektinas – dimerinis fibrilinis baltymas, kurio dvi molekules sudarančios polipeptidinės grandinės turi kitų kolageno, GAG surišimo vietas. Tai padeda šias molekules įtvirtinti EM. Fibronektino grandinės taip pat turi ląstelės paviršiaus receptorių jungimo vietas,

kuriomis ląstelės stabiliai pritvirtinamos prie tarpląstelinio užpildo. Fibronektinas veikia kaip V raidės pavidalo dimeras: dvi grandinės susijungia arti C galų disulfidiniais tilteliais. Yra žinomos dvi fibronektino formos – tirpus kraujo plazmos baltymas, kurį sintetina hepatocitai, ir audinių baltymas, kurį sintetina fibroblastai. Išvalytas fibronektinas dažnai vartojamas padengti paviršiams, prie kurių prisitvirtina *in vitro* auginamos ląstelės (Cooper, 2000).

Lamininas – glikoproteinas, svarbiausias pamatinės laminos komponentas, kuris atlieka struktūros funkciją bei veikia ląstelių sugebėjimą diferencijuotis ir dalintis. β ir γ grandinių trumposios rankos pačios sukimba su kitų laminino molekulių atitinkamais segmentais, ir susidaro į veltinį panaši plėvelė. Molekulė turi EM ir ląstelės paviršiaus surišimo vietas, taip pat gali jungtis su kitomis laminino molekulėmis, heparansulfato proteoglikanais ir IV tipo kolagenu (Meredith ir kt., 1993; Lodish ir kt., 2000).

1.5. Sutelktinis sąlytis ir jo aktyvinami signaliniai keliai

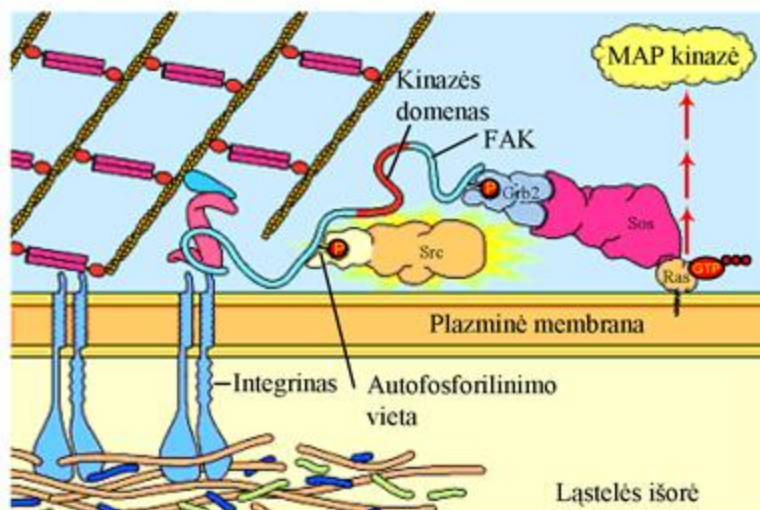
1.5.1. Sutelktinis sąlytis – fokalinė adhezija

Ląstelių tarpusavio sukibimui į bendrą visumą, informacijos ir cheminių medžiagų keitimuisi yra ypatingai svarbios ląstelių plazminių membranų sandų formuojamos struktūros – ląstelių jungtys. Viena iš tokių jungčių – sutelktinis sąlytis (*angl.* focal adhesion), pirmą kartą aprašyta 1961 m., yra dinamiška jungtis, galinti lengvai suirti, jeigu ja prie EM ar dirbtinio substrato prisitvirtinusi ląstelė yra paskatinama judėti arba dalintis. Ši jungtis priklauso nuo EM ir ląstelės sąveikos. Tai daugiau struktūrinis kompleksas, kurio pagrindinė funkcija – informacijos perdavimas per signalines molekules iš arba į ląstelę (Ambrose, 1961).

Daug žinių apie sutelktinį sąlytį gauta tiriant ląsteles, auginamas *in vitro*, tačiau jis aptinkamas ir gyvuose audiniuose, pvz., raumenyse ir sausgyslėse. Sutelktinis sąlytis geba sukurti mechaninę jėgą, kuri priklauso nuo aktino, ir į ją reaguoti. Sutelktinio sąlyčio vietoje ląstelės plazmalemoje susitelkia daug integrino molekulių, kurios sujungia tarpląstelines struktūras su ląstelės griaučių baltymais: ląstelės išorėje integrinai jungiasi su EM baltymais (fibronektinu, lamininu) arba sintetinė medžiaga, o ląstelės viduje pagalbiniais baltymais integrinai jungiasi su aktino gijomis. Aktyvinti integrinai perduoda signalus į ląstelės vidų, keičia ląstelės ryšius su užpildu, reguliuoja genų raišką (Lu ir kt., 2001). Citozolinėje pusėje prie integrinų sankaupų telkiasi specializuoti baltymai – sutelktinių sąlyčių kinazės (receptorinės tirozino kinazės (toliau tekste: RTK) arba FAK kinazės perduodančios integrinų signalus.

Sąveikos aktyvina FAK kinazes, kurios fosforilina ir taip aktyvina viena kitą. Fosforilintos baltymų sekos pritraukia Src kinazes, kurios dar intensyviau fosforilina FAK ir sutelkia integrinų atsako baltymus. Daugelis kultūrose auginamų ląstelių pradeda dalytis tik

prisitvirtinusios prie paviršiaus (Hauck ir kt., 2002). Dalijimosi signalus FAK perduoda aktyvindama MAP (*angl.* mitogen – activated protein kinase, toliau tekste: MAP) kinazių atsako kelią (7 pav.). Ląstelių dalijimąsi skatina jungtinė signalų grandinė, sklindanti iš augimo veiksnių aktyvinamų receptorių ir iš integrinų sudarytų ryšių. Tokie signalai yra ilgalaikiai ir patikimai aktyvina ląstelės dalijimosi ciklą. Integrinų sudaromi ryšiai taip pat yra svarbūs ląstelių išgyvenimui. Praradusios ryšius su EM ląstelės miršta (Parsons ir kt., 2000; Owen ir kt., 2005).



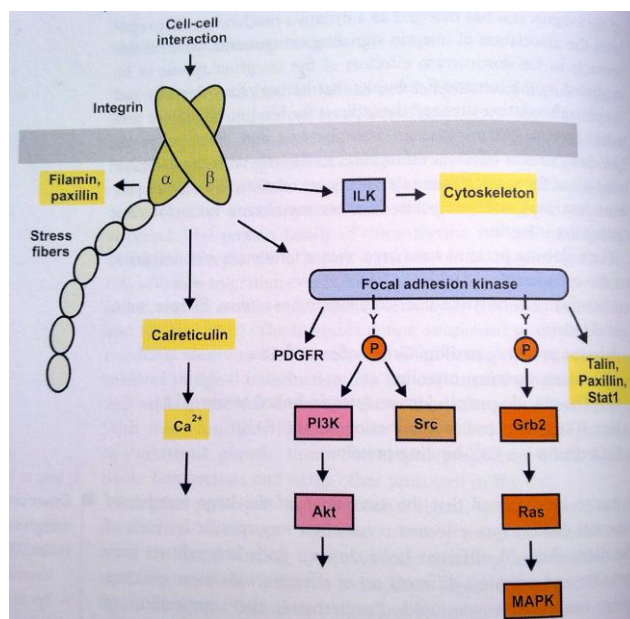
7 pav. MAP kinazių aktyvinimas dalyvaujant sutelktinių sąlyčių kinazei (Cooper, 2000)

Perduodant signalą taip pat dalyvauja ir ląstelių tarpusavio sąveikos baltymai (selektinai, imunoglobulinai ir kadherinai). Geriausiai ištirtas kadherinų aktyvinamas signalo perdavimo kelias. Kadherinai – vieną kartą plazminę membraną kertantys baltymai, kurie sąveikaudami su substratu sudaro dimerus ar didelius oligomeras. Citozolinis kadherinų domenas sąveikauja su ląstelės griaučiais (aktino baltymais) ir taip valdo ląstelės formą, judrumą. Kadherino ir aktino sąveikoje tarpininkauja citozolio baltymai β kateninai. Jie signalus perduoda citozolinėms Rho šeimos GTPazėms, kurios siunčia signalus, keičiančius ląstelės griaučių struktūrą, kartu ir ląstelės formą bei judrumą (Xia ir kt., 2004). Tyrimai parodė, kad, esant patikimiems ryšiams tarp ląstelių, Rho signalai sustiprina augimo veiksnių signalus ir skatina ląstelės dalijimąsi. Kadherinų signalai taip pat aktyvina PI3 kinazę (*angl.* phosphatidylinositol 3 – kinase, toliau tekste: PI3K), kuri dalyvauja perduodant ląstelės išgyvenimo signalus (Farrar ir kt., 2005).

1.5.2. FAK signalinis kelias

FAK – fokalinės adhezijos kinazė, bereceptorinis baltymas, dažniausiai aptinkama sutelktinio sąlyčio – fokalinės adhezijos vietoje. Ji reguliuoja ląstelių migraciją, gali lemti

ląstelių išgyvenimą, slopinti apoptozę. Kai kuriais atvejais veikia kaip metabolitinių procesų signalinė molekulė, nulemianti, kuri kelią vėliau pasirinks ląstelė (8 pav.)



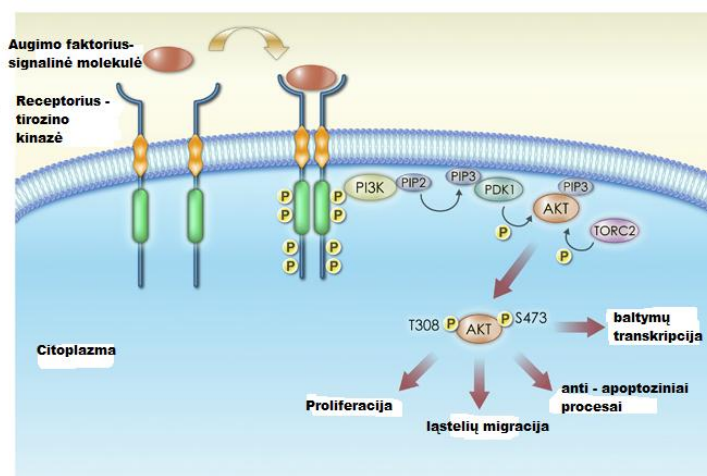
8 pav. FAK ir jos aktyvinami signaliniai keliai (Krauss, 2008)

Skirtingų kelių pasirinkimas priklauso ir nuo tarpinių junginių, kurie ir nulemia ląstelės atsaką – ląstelių išgyvenimą, proliferaciją, ląstelių judrumą, žūtį apoptozės ar nekrozės keliu (Parsons ir kt., 2000; Parsons, 2003). Tokie FAK signalinio kelio tarpiniai junginiai yra Src, PI3K ar tarpląstelių signalų perdavimo tarpininkai, aktyvinantys, MAP kinazių kelią – Ras baltymai (*angl.* related proteins, toliau tekste: Ras). Integrino receptoriai, sąveikaudami kartu su EM molekulėmis, fosforilina ir aktyvina FAK. Toliau yra fosforilinamos ir aktyvinamos Src, PI3K, MAP kinazės ir galiausiai pastarojo signalinio kelio kinazė – ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė (*angl.* extracellular signal – regulated kinases, toliau tekste: ERK). Ši kinazė, sąveikaudama su pagalbinėmis molekulėmis, reguliuoja ląstelių išgyvenimą, migraciją. Nuo aktyvintų molekulių priklauso kokių kelių ir kaip reaguos ląstelė: ar aktyvuosis už apoptozę atsakingos molekulės, ar ląstelės keliaus į kitus audinius. FAK aktyvaciją gali sustiprinti įvairūs augimo veiksniai – EGF, PDGF, bFGF, stimuliuojantys ląstelių receptoriai. Priešingą reakciją, t.y. FAK funkcijos slopinimą atlieka – FAK inhibitoriai, kurie aktyvina molekules, slopinančias apoptozę, skatina ląstelių dauginimąsi (Huang ir kt., 2009; Krauss, 2008).

1.5.3. PI3K/Akt signalinis kelias

PI3K – fosfatidylinozitol – 3 kinazė – tai lipidų kinazė. Lipidai generuoja 3' – fosfatidilinozitudus, kurie rišasi prie kitų baltymų plekstrino homologijos (toliau tekste: PH) domenu, taip pritraukdami baltymus prie membranos arba modifikuodami jų aktyvumą. Tai užtikrina jų dalyvavimą viduląstelinio signalo perdavime. PI3 kinazės yra heterodimeriniai baltymai, susidedantys iš 2 subvienetų: reguliacinio ir katalitinio. PI3K dalyvauja įvairiuose signaliniuose keliuose bei metabolinių procesų reguliacijoje. Šios kinazės skirstomos pagal lipidų substrato specifiškumą, struktūrą ar reguliavimo sritis (Osaki ir kt., 2004, Patel ir Mohan, 2005).

PI3K/Akt (*angl.* protein kinase B (PKB), toliau tekste: Akt) signalinis kelias reguliuoja ląstelių adheziją, diferenciaciją, judrumą bei proliferaciją. Šiame signaliniame kelyje pirmiausia (9 pav.) aktyvuojamas ląstelės membranoje esantis receptorių, kuris fosforilina ir aktyvina PI3K. Aktyvi PI3K toliau fosforilina fosfatidilinozitol 4, 5 – trifosfatą (*angl.* phosphatidylinositol (4, 5) – biphosphate, toliau tekste: PIP2), kuris paverčiamas į naują produktą – fosfatidilinozitol 3, 4, 5 – trifosfatą (*angl.* phosphatidylinositol (3, 4, 5) – trisphosphate, toliau tekste: PIP3). Tuomet prie membranos pritraukiama protoonkogeno koduojama serino / treonino specifinė baltymų kinazė Akt ir nuo fosfoinozitudų piklausoma kinazė 1 (*angl.* pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1, toliau tekste: PDK1), kurios sąveikauja su PIP3 PH domenu. PDK1 fosforilina ir aktyvina Akt. Be PDK1, Akt fosforilinti gali PDK2 bei su integriniais susijusi kinazė (*angl.* integrin – linked kinase, toliau tekste: ILK). Akt fosforilinimas vyksta dviejose vietose: MH srityje ir T kilpoje, kuriose yra fosforilinami Thr 308 and Ser 473 (Patel ir Mohan, 2005; Huang ir kt., 2011).



9 pav. PI3K/Akt signalinis kelias (Garcia – Echeverria ir Sellers, 2008)

Aktyvi Akt, toliau fosforilina ir aktyvina kitas signalines molekules, reguliuojančias svarbius ląstelės procesus: glikogeno metabolizmą (reguliuoja GSK aktyvumą), ląstelių proliferaciją, išgyvenimą (fosforilina bei nuslopina kaspazę 9 ir Bad), genų transkripciją (fosforilina Forkhedo šeimos baltymus) (Kimura ir Nakano, 2009). Akt identifikuojama kaip klasikinis viruso onkogenas (Krauss, 2008).

Naujausi autoimuninių ligų tyrimai rodo, jog PI3K/Akt signalinio kelio funkciniai sutrikimai (kai kurių baltymų sintezės netikslumai) sąlygoja sunkias autoimunines ligas - vilkligę, autoimuninį limfoproliferacinį sindromą (Patel ir Mohan, 2005).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudotos medžiagos

Ląstelių auginimui buvo naudojama terpės Iscove's modifikuota Dulbecco terpė (IMDM) (*Sigma – Aldrich*), praturtinta 10 % fetaliniu veršelio serumu (toliau tekste: FVS) (*Sigma – Aldrich*) ir antibiotikais (penicilinu (100 TV/mL), streptomicinu (100 µg/mL), nistatinu (200 TV/mL)) (*Lonza*). Biopsijos audinio transportavimui naudota IMDM terpė be serumo su trigubomis antibiotikų – penicilino, streptomicino ir nistatino koncentracijomis. Adhezinių ląstelių monosluoksnio suardymui naudotas 0,25 % tripsino – EDTA (etilendiamino tetraacto rūgštis) tirpalas (*Biological Industries*).

Etanolis 96,3⁰ (*Vilniaus degtinė*); ląstelių proliferacijos rinkinys (*angl.* The Cell Proliferation Kit; toliau tekste: XTT) (*Biological Industries*); MTT (3 – (4,5 – dimetiltiliazol – 2 – yl) – 2,5 – difeniltetrazolio bromidą) reagentas (*Sigma – Aldrich*); 3,3',5,5' – tetrametilbenzidinas (toliau tekste: TMB) (*Sigma – Aldrich*); 0,4 % tripano mėlio tirpalas (*Sigma – Aldrich*); akridino oranžas (toliau tekste: AO) (*Molecular Probe*); etidžio bromidas (toliau tekste: EB) (*Molecular Probe*); fosfatinis buferis ((80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl), toliau tekste: FB) (*Gibco*); 0,1 % Triton X – 100 reagentas (*AppliChem*); 4 % paraformaldehidas (*Sigma – Aldrich*); 2,5 % glutaro aldehido tirpalas (*Sigma – Aldrich*); 2 % vandeninis osmio tetroksidas (*Sigma – Aldrich*); pirminiai antikūnai prieš FAK, Akt, fosfo – Akt (*Cell Signaling*), β – aktiną (*Millipore*) bei fosfo – FAK (*BD Transduction Laboratories*); atitinkami antriniai antikūniai konjuguoti su krienų peroksidaze (*Millipore*); sieros rūgštis (H₂SO₄) tirpalas (*Sigma – Aldrich*); 10 mM β – glicerofosfatas (*Sigma – Aldrich*); 10 – 8 M deksametazonas (*Sigma – Aldrich*); 5 µg/ml askorbino rūgštis (C₆H₈O₆) (*Sigma – Aldrich*); acto rūgštis (CH₃COOH) (*Sigma – Aldrich*); Decon 5 % tirpalas (*Decon Laboratories Limited*); fosfato – citrato tirpalas (*Gibco*); 0,01 % kolageno tirpalas (*Sigma – Aldrich*); 20 µg/ml laminino tirpalas (*Millipore*).

Kompiuterinė modeliavimo programinė įranga – (*angl.* computer aided design, toliau tekste: CAD); kompiuteriu kontroliuojama frezavimo (*angl.* computer aided manufacturing, toliau tekste: CAM) įranga (D5, Datron); lazeris – Expla NL640; UV; ląstelių auginimo flakonai; termostatas 37 °C, kuriame palaikoma 5 % anglies dioksido (toliau tekste: CO₂); pipetės; spektrofotometras – Termo Scientific Varioskan Flash; purtyklė Eppendorf Thermomix Comfort; 96 duobučių plokštelės; invertuotas mikroskopas Olympus CKX41, šviesinis mikroskopas Carl Zeiss Jena 30 – g047c, fluorescentinis mikroskopas NIKON Eclipse TS 100; skenuojanti elektroninis mikroskopas (SEM) TM – 1000 Tabletop Microscope, Hitachi

High – Technologies Corporation; tėkmės citometras BD FACSCantoII, tėkmės citometro duomenų analizės atlikta: BD FACS Diva programine įranga.

2. 2. Tyrimo metodai

2. 2. 1. Protezinių mėginių gamyba ir paruošimas eksperimentams

Titaniniai mėginiai išfrezuoti naudojantis CAM bei įranga D5, jų paviršius modifikuotas lazeriu Vilniaus universiteto Lazerinių tyrimų centre. Modifikuoto paviršiaus gylis – 15 μm . Paruošti dviejų dydžių mėginiai: 5 mm x 2 mm ir 10 mm x 5 mm, atitinkamai skersmuo x storis. Visi mėginiai po gamybos ir apdirbimo buvo identiški. Eksperimentams ruošiami mėginiai pirmiausia buvo laikomi 5 % Decon tirpale 24 val., 20 kartų plaunami vandeniu ir 2 kartus distiliuotu vandeniu. Tada mėginiai buvo sterilinami 1val. 96,3⁰ etanolyje bei 15 min. UV šviesoje. Taip paruošti mėginiai naudoti eksperimentuose.

2.2.2. Dantenų biopsija, dantenų fibroblastų išskyrimas ir pirminių ląstelių linijų gavimas

Gingivektomijos metu buvo paimamas žmogaus dantenų subepitelinis 2 – 3 mm storio audinys, perkeliamas į transportavimo terpę (IMDM terpė be serumo su trigubomis antibiotikų – penicilino, streptomicino ir nistatino koncentracijomis). Mėginiai buvo imami gavus paciento bei Vilniaus Universiteto regioninio bioetikos komiteto leidimus (No. 158200 – 11 – 116 – 28).

Biopsijos metu paimtas audinio gabaliukas buvo mechaniškai susmulkinamas ir užpilamas auginimo terpe (IMDM su FVS ir antibiotikais). Ląstelės augintos 37 ⁰C termostate, esant 5 % CO₂ (Saczeko ir kt., 2008). Maždaug po 1 – 2 savaičių susiformavo kamieninių ląstelių monosluoksnis, gauta pirminė ląstelių kultūra, kuri buvo persėjama 1 – 2 kartus per savaitę. Tokiu būdu gauta pirminė ląstelių linija.

2.2.3. Ląstelių auginimas *in vitro*

Ląstelių monosluoksnis flakonėlyje buvo apžiūrimas invertuotu mikroskopu, augimo terpė nupilama, o ląstelių monosluoksnis 2 kartus praplaunamas EDTA – tripsino tirpalu. Paskutinį kartą praplovus, buvo paliekama apie 0,5 ml tirpalo ir flakonėlis 3 – 5 min. dedamas į 37 ⁰C termostatą. Tada ląstelių monosluoksniui disocijavus, suspensija buvo praskiedžiama šviežia terpe ((IMDM) su FVS ir antibiotikais), ląstelės suskaičiuojamos ir išsėjamos į naujus flakonėlius arba naudojamos eksperimentuose.

2.2.4. Ląstelių skaičiaus ir jų gyvybingumo įvertinimas tripano mėliu

Ląstelių skaičius ir gyvybingumas buvo nustatomas, remiantis negyvų ląstelių membranos pralaidumu – negyvos ląstelės, ypač jū branduoliai, dažosi mėlyna spalva (Seglen, 1976). Vertinimui naudotas 0,4 % tripano mėlio tirpalas, paruoštas FB. Ląstelių monosluksnis buvo suardomas 0,25 % tripsino – EDTA tirpalu, ląstelės praskiedžiamos auginimo terpe, gauta ląstelių suspensija lygiomis dalimis sumaišoma su paruoštu tripano mėlio tirpalu. Skaičiuota Gorajjevo kameroje, naudojant šviesinį mikroskopą.

Gautas gyvų ląstelių skaičius išreiškiamas ląstelių skaičiumi viename mililitre ląstelių suspensijos (ląstelių sk./ml):

$$N = \frac{a \cdot 1000 \cdot n}{V};$$

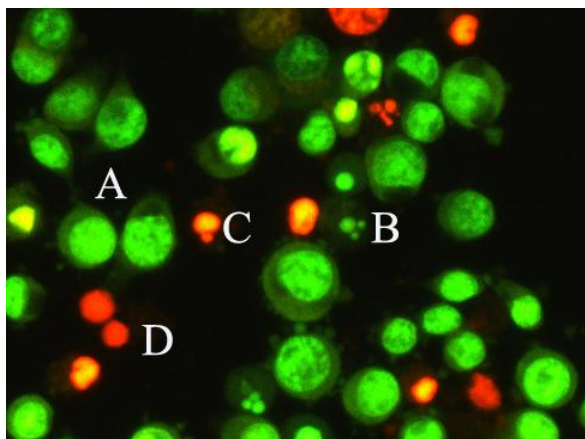
Kur: a – ląstelių skaičius kameroje;

n – praskiedimas;

V – kameros tūris lygus 0,9 mm³.

2.2.5. Ląstelių gyvybingumo vertinimas su AO/EB mišiniu

Ląstelių gyvybingumas tiriamas liuminescencinės mikroskopijos metodo pagalba, naudojant fluorescuojantį, su deoksiribonukleorūgštimi (toliau tekste: DNR) besijungiantį dažų mišinį: AO – 100 µg/ml ir EB – 100 µg/ml ištirpintus FB. 25 µl ląstelių suspensijos imama 1 µl dažų mišinio. 10 µl tokio paruošto mišinio dedama ant objekcinio stiklelio, uždengiama dengiamuoju stikleliu. Analizuojama fluorescenciniu mikroskopu. AO įjungia gyvos ir negyvos ląstelės. Šis dažas interkaliojasi į dvigrandę DNR ir nudažo branduolį žaliai. AO taip pat jungiasi su ribonukleorūgštimi (toliau tekste: RNR) ar viengrandę DNR ir nudažo rausvai oranžine spalva. EB jungia tik negyvos ląstelės, nes gyvų ląstelių membrana nepraleidžia šio dažo. EB sąveikauja su DNR ir nudažo branduolį oranžine, RNR – silpnai oranžine spalva. Taigi, pagal gyvų ir negyvų ląstelių dalį šiame skaičiuje galima spręsti apie ląstelių gyvybingumą. Tokiu būdu dažant ląsteles, jų populiacijoje galima išskirti keturių rūšių ląsteles (10 pav.): gyvas (ryškiai žalias branduolys); gyvas apoptozines (kondensuotas ar fragmentuotas branduolys, spindi žalsvai); negyvas apoptozines (branduolys fragmentuotas, oranžinės spalvos); nekrozines (branduolys vientisas, nusidažęs oranžine spalva; citoplazmos likučiai tamsiai rusvi) (Mercille ir Massie, 1994).



10 pav. Diferencijuotas ląstelių dažymas AO/EB dažų mišiniu: A – gyvos ląstelės, B – gyvos apoptozinės ląstelės, C – negyvos apoptozinės ląstelės, D – nekrozinės ląstelės. Fotografuota fluorescenciniu mikroskopu NIKON Eclipse TS 100

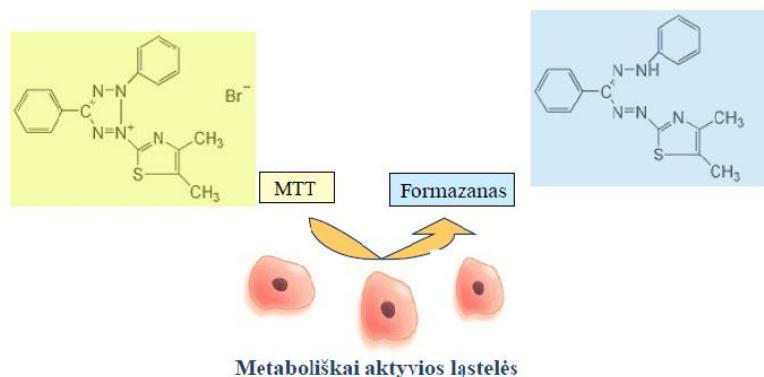
2.2.6. Ląstelių adhezijos vertinimas naudojant XTT

Tai kalorimetrinis metodas, kurio metu aktyvią medžiagų apykaitą vykdančios ląstelės tetrazolio druską XTT redukuoja iki vandenyje tirpaus formazano, o terpė tampa oranžinės spalvos.

Paruošiama ląstelių suspensija, kurios tankis 50 tūkst. ląst./ml, kuri išsėjama į 96 duobučių plokštelę su steriliais tiriamaisiais mėginiais. Inkubuojama termostate 37 °C, 5 % CO₂ nustatytą laiko intervalą – 0,5, 1 ir 2 val. Praėjus nustatytam laikotarpiui plokštelė su mėginiais buvo purtoma Eppendorf Thermomix Comfort, Webers purtykle: 600 rpm dažniu, 45 s. Po purtymo augimo terpė su atkibusiomis/neprilipusiomis ląstelėmis buvo pašalinama, o ant likusių prikibusių ląstelių buvo užpilama nauja auginimo terpė (150 µl) ir dedama 50 µl šviežiai paruošto XTT reagento. XTT reagentas buvo ruošiamas pagal gamintojo rekomendacijas. Inkubuojama termostate 37 °C, 5 % CO₂, 30 min. Po 100 µl terpės iš kiekvienos duobutės buvo perkeliama į naują plokštelę ir matuojamas optinis tankis spektrofotometru Thermo Scientific Varioskan Flash, 450 nm. Analizuojami gauti rezultatai.

2.2.7. Ląstelių proliferacijos vertinimas naudojant MTT

Dantenų fibroblastų ląstelių proliferacija buvo vertinama naudojant MTT reagentą. Metodas paremtas gyvų ląstelių mitochondrijų fermentų gebėjimu tirpų geltonos spalvos MTT redukuoti iki violetinės spalvos netirpius kristalus formuojančio formazano (11 pav.). Gyvų ląstelių skaičius yra tiesiogiai proporcingas susidariusio produkto – formazano, kiekiui, kuris įvertinamas spektrofotometriškai 570 nm bangos ilgyje, gautus netirpius kristalus ištirpinus etanolyje.



11 pav. MTT redukcijos reakcija (Huamin ir kt., 2002)

Paruošiama ląstelių suspensija, kurios tankis 30 tūkst. ląst./ml, kuri išsėjama į 24 duobučių plokštelę su steriliais tiriamaisiais mėginiais. Inkubuojama termostate 37 °C, 5 % CO₂ nustatytą laiko intervalą – 24, 48 ir 72 val. Po nustatyto laikotarpio, augimo terpė buvo pašalinama, o ląstelių monosluoksnis užpilamas proliferacijos intensyvumo įvertinimui naudotu 0,2 mg/ml MTT tirpalu paruoštu FB, kurio buvo pilama 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. Inkubuojama 1 val., susidariusios nuosėdos tirpinamos etanoliu (96,3⁰), kurio pilama 500 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. Optinis tankis matuojamas spektrofotometriškai, 570 nm bangos ilgyje (spektrofotometru – Termo Scientific Varioskan Flash). Gautas optinis tankis yra proporcingas gyvų ląstelių skaičiui.

Gauti rezultatai išreiškiami santykiniu gyvybingumu t.y., santykiu optinio tankio, išmatuoto po tam tikro laikotarpio (24, 48 ir 72 val.) su optiniu tankiu išmatuotu ląstelių proliferacijos vertinimo pradžioje:

$$\text{Santykinis gyvybingumas} = \frac{(\text{Gyvų ląstelių skaičius/optinis tankis, nustatytas po tam tikros trukmės tiriamojo poveikio})}{(\text{Gyvų ląstelių skaičius/optinis tankis, nustatytas prieš tiriamąjį poveikį})}$$

2.2.8. Mėginių paruošimas skenuojančiai elektroninei mikroskopijai

Tiriami mėginiai užsėjami ląstelių suspensija, kurios tankis 30 tūkst. ląst./cm². Po 24 valandų pašalinama augimo terpė, o ląstelės fiksuojamos 2,5 % glutaro aldehido tirpalu 30 min. kambario temperatūroje, 3 kartus po 10 min. plaunama distiliuotu vandeniu. Vėliau fiksuojama 2 % vandeniniu osmio tetroksidu 20 min. kambario temperatūroje, plaunama distiliuotu vandeniu (3 x 10 min.). Tada mėginiai dehidratuojami etanoliumi didėjančiomis koncentracijomis: 25 %, 50 %, 75 %, 90 % ir 96 % (kiekvienoje koncentracijoje inkubuojama po 5 min.). Mėginiai džiovinami naudojant kritinio taško džiovintuvą, padengiami 20 nm aukso

sluoksniu, naudojant vakuuminį dengimą. Bandiniai analizuojami skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (SEM) TM – 1000 Tabletop Microscope, Hitachi High – Technologies Corporation.

2.2.9. Ląstelių charakterizavimas

Tiriamų ląstelių populiacija buvo analizuojama dviem būdais:

Paviršiaus žymenys buvo vertinami FACS analizės metodu, panaudojant monokloninių antikūnų rinkinį prieš Stro – 1, CD19, CD44, CD45, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 (R&D Systems). Analizei ląstelės paruoštos pagal gamintojo instrukciją: paruošiama ląstelių suspensija, kurios tankis 1 mln. ląst/ml, FB. 90 µl ląstelių suspensijos perkeliama į 5 ml mėgintuvėlį ir pridedama 10 µl antikūnų tirpalo; inkubuojama 0,5 val. 8 °C temperatūroje, praplaunama 2 kartus FB; ląstelių suspensija suspenduojama 200 µl FB ir pridedama antikūnų konjuguotų su fluorochromais, inkubuojama 0,5 val. tamsoje, 8 °C temperatūroje; po inkubacijos 2 kartus plaunama FB. 400 µl ląstelių suspensijos analizuojama tėkmės citometru BD FACSCantoII, analizuojama naudojant BD FACS Diva programinę įrangą.

Imunocitochemija. Ląstelės augintos 30 mm skersmens petri lėkštelėse su dengiamaisiais stikliukais ant dugno. Auginimo terpė – Iskovo su 10 % FVS, penicilino (100 U/ml), streptomicino (100 µg/ml), 37 °C. Ląstelės išsėtos tokiu tankiu, kad po paros ląstelių monosluoksniis sudarytų 70 – 80 %. Ląstelės fiksuotos 4 % paraformaldehidu 5 – 10 min., plautos 4 kartus inkubuojant po 5 min. FB, blokuotos 5 % ožkos serumu FB per naktį 4 °C temperatūroje, inkubuota su pirminiais antikūnais prieš integriną β1, kolageną, fibronektiną, vimentiną, FSP – 1 baltymą, CD14, CD45 ir CD54 per naktį 4 °C temperatūroje, plauta 4 kartus inkubuojant po 5 min. FB, inkubuota su atitinkamais antriniiais antikūnais su Cy3 2 val. kambario temperatūroje, plauta 3 kartus FB, inkubuota su 10 µg/ml DAPI 10 min, plauta 2 kartus su FB. Dengiamieji stikliukai dėti ant objektinių stikliukų, analizuota fluorescentiniu NIKON Eclipse TS 100 mikroskopu. Vimentinas nustatytas naudojant antrinius antikūnus konjuguotus su krienų peroksidaze (inkubacija ir plovimai tokiomis pačiomis sąlygomis), substratu naudotas TMB (3,3', 5,5" – tetrametilbenzidinas), su kuriuo inkubuota 10 min. Kokybiškai analizuota pagal susidariusią spalvinę reakciją.

2.2.10. Imunofermentinė reakcija ląstelių pagrindu

50 tūkst. ląstelių/cm² ląstelių buvo užsėjama ant tiriamų mėginių paviršiaus. Po 24 valandų pašalinama augimo terpė, o ląstelės fiksuojamos 10 min. 4 % paraformaldehido tirpalu, plaunama 0,1 % Triton X – 100 tirpalu 3 kartus inkubuojant po 5 min. (abu tirpalai ruošiami – FB). Blokuojama 10 % FVS 2 val. kambario temperatūroje. Pašalinus blokavimo tirpalą,

inkubuojama su pirminiais antikūnais prieš FAK, fosfo – FAK, Akt, fosfo – Akt ir β – aktiną 2 val. kambario temperatūroje. Pirminiai antikūniai ruošiami blokavimo tirpale. Plaunama 0,1 % Triton X – 100 tirpalu 3 kartus po 5 min., inkubuojama su atitinkamais antriniais antikūnais, konjuguotais su krienų peroksidaze 1 val. kambario temperatūroje. Plaunama 2 kartus 0,1 % Triton X – 100 tirpalu ir 3 kartus FB. 0,5 val. inkubuojama su TMB, paruoštu fosfato – citrato buferyje. Reakcija stabdoma 2 M H_2SO_4 tirpalu. Susidaręs produktas išmatuojamas Termo Scientific Varioskan Flash spektrofotometru 450 nm bangos ilgyje.

2.2.11. Titaninių mėginių dengimas kolagenu ir lamininu

Titaniniai mėginiai ruošiami kaip aprašyta 2.2.1. Paruošiami 0,01 % kolageno ir 20 μ g/ml laminino tirpalai (abu ruošiami FB). Po 1 ml paruoštų tirpalų buvo užpilama ant mėginių ir laikoma 24 val. 8 °C temperatūroje. Vėliau tirpalai pašalinami, o mėginiai plaunami FB, ir sterilinami 15 min. UV. Vertinama tarpląstelinio užpildo komponentų įtaka tiriamų ląstelių adhezijai ir proliferacijai.

2.2.12. Diferenciacijos iniciacija osteogenine linkme

Ląstelės užaugintos standartinėje IMDM terpėje, praturtintoje 10 % serumo. Ląstelėms pasiekus maždaug 80 % tankį, terpė pakeista, į ją pridėta 10 – 8 M deksametazono, 5 μ g/ml askorbino rūgšties ir 10 mM β – glicerofosfato. Inkubuota 4 – 6 paras. Po diferencijuojančio poveikio ląstelės buvo fiksuotos 4 % paraformaldehidu, paruoštu fosfatiniame buferyje, plautos FB (pH 4,2 – 4,5), dažytos 2 % alizarino raudonuoju dažu (pH 4,2), analizuota invertuotu mikroskopu Olympus CKX41.

Kiekybinis osteogeniės diferenciacijos vertinimas: susidariusios Ca sankaupos, nudažytos alizarinu S, tirpintos 10 % acto rūgštyje 10 min. kaitinant 85 °C temperatūroje, po to atšaldyta lede. Susidaręs spalvotas produktas išmatuotas Termo Scientific Varioskan Flash spektrofotometru 450 nm bangos ilgyje.

2.2.13. Statistinė duomenų analizė

Statistinė rezultatų analizė atlikta naudojant Microsoft Excel 2007 programą. Rezultatai išreikšti kaip 3 – 5 eksperimentų metu surinktų duomenų vidurkiu $\pm$ standartinis nuokrypis.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Titano implantai, pasižymintys mechaniniu tvirtumu, cheminiu stabilumu ir biosuderinamumu, šiuo metu yra vieni populiariausių protezinių medžiagų, naudojamų prarastų dantų atstatymui. Pagrindinis jų trūkumas – silpna sąveika su minkštaisiais audiniais, lydima dantenų plonėjimo ir/ar atsitraukimo – recesijos. Žinoma, kad kokybišką, ilgalaikę dantų implantų ir juos supančių kietųjų (kaulo) bei minkštųjų audinių sąveiką lemia implanto paviršiaus savybės. Todėl ieškoma efektyvių būdų implantų paviršiaus adhezinėms savybėms pagerinti. Šiame darbe buvo tiriamos įvairios titano mėginių paviršiaus modifikavimo strategijos, vertinamas šių paviršiaus modifikacijų poveikis žmogaus dantenų fibroblastų savybėms (toliau tekste: ŽDF) – adhezijai, proliferacijai, diferenciacijai.

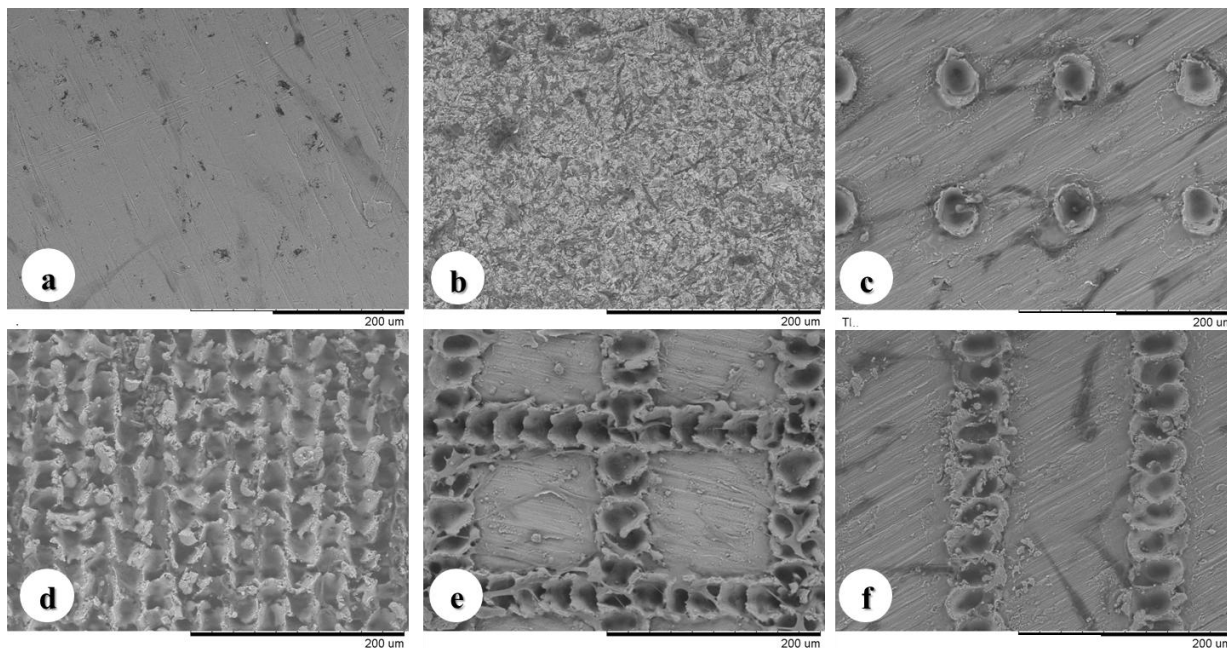
3.1. Titano mėginių paruošimas ir jų paviršiaus modifikavimas

Yra atlikta nemažai tyrimų rodančių, kad ankstyva implanto osteointegracija nulemia ilgalaikį jų klinikinį efektą (Davies, 2003; Marco ir kt., 2005). Siekiant pagerinti osteointegracijos procesą – baltymų adsorbciją, ląstelių adheziją, diferenciaciją, yra pasiūlyta įvairių implantų paviršiaus modifikavimo būdų – fizikinių, cheminių, biologinių (Lavenus ir kt., 2011; Guilem – Marti ir kt., 2012). Nustatyta, kad mėginių topografija arba paviršiaus šiurkštumas yra vienas iš esminių faktorių veikiančių fibroblastų savybes *in vivo* ir *in vitro* (Suk – Won ir kt., 2008).

Taigi, šiame darbe vertinome, kaip titano mėginių paviršiaus topografijos pakeitimas fizikiniais metodais veikia žmogaus dantenų fibroblastų savybes. Tuo tikslu, pagaminti titano mėginiai buvo veikiami smėliasrove ar modifikuojami lazeriu. Titano mėginių paviršiaus modifikavimas buvo atliekamas Vilniaus universiteto Lazerinių tyrimų centre. Tokiu būdu buvo gautos penkios mėginių grupės su įvairiai pakeistomis paviršiaus savybėmis, palyginimui buvo naudoti titano mėginiai, kurių paviršius nebuvo modifikuotas.:

- nemodifikuotas paviršius (Ti-N);
- Ti paviršius, šiurkštintas smėliasrove (Ti-S);
- Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai (Ti-L-t);
- Ti modifikuotas lazeriu – susiliejęs taškai (Ti-L-st);
- Ti modifikuotas lazeriu – grotelės (Ti-L-g);
- Ti modifikuotas lazeriu – linijos (Ti-L-l).

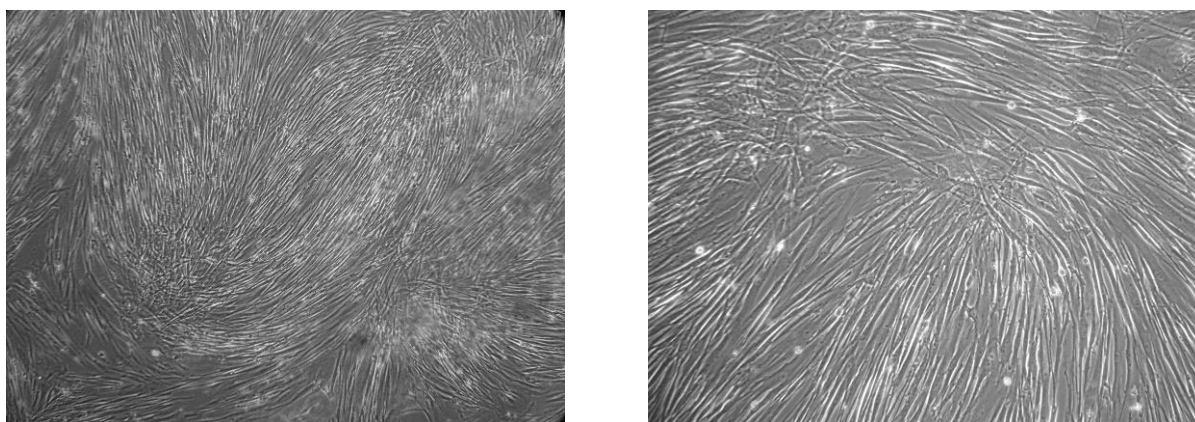
Visi mėginiai po gamybos ir apdirbimo buvo identiški – visų modifikacijų gylis – 15 μm , o jų paviršiaus topografija buvo įvertinta naudojant skenuojančią elektroninę mikroskopiją (toliau tekste: SEM) (12 pav.).



12 pav. Titano mėginiai ir jų paviršiaus modifikavimo būdai: a – nemodifikuotas paviršius (Ti-N), b – Ti paviršius, šiurkštintas smėliasrove (Ti-S), c – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai (Ti-L-t), d – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejęs taškai (Ti-L-st), e – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės (Ti-L-g), f – Ti modifikuotas lazeriu – linijos (Ti-L-l)

3.2. Dantenu fibroblastų linijų gavimas ir jų charakterizavimas

Toliau buvo vertinta gautų modifikuotų titano mėginių bei žmogaus dantenu fibroblastų sąveika, nes minkštųjų audinių žiedo susidarymas apie dantų implantą yra pagrindinė sąlyga sėkmingai jo osteointegracijai. Tuo tikslu, gavus paciento sutikimą, buvo atlikta dantenu biopsija, kurios metu buvo paimtas žmogaus dantenu subepitelinis 2 – 3mm storio audinys ir gauta pirminė ląstelių linija – ŽDF (13 pav.). Šio linijos 10 – 30 persėjimų ląstelės buvo naudojamos tiriant jų savybes, sąveikos su įvairiai modifikuotais titano paviršiais metu.



A

B

13 pav. Žmogaus dantenu fibroblastų linijos ląstelės, auginamos *in vitro*. Ląstelių monosluoksniu natyvinis vaizdas gautas invertuotu mikroskopu: Olympus CKX41: A – (x40), B – (x100)

Dantį supančius audinius arba apydančią (periodontą) sudaro alveolinis kaulas, raiščiai, laikantys dantį kaulo ertmėje, bei dantenos (Schroeder ir kt., 1973). Todėl iš šios srities galima išskirti įvairios kilmės – danties folikulo kamienines ląsteles, dantenų mezenchiminės kilmės kamienines ląsteles, periodonto raiščio kamienines ląsteles, dantenų fibroblastus. Čia aptinkama ir danties pulpos kamieninių ląstelių (Lindroos ir kt., 2008). Todėl gautas ŽDF linijos ląsteles charakterizavome. Pirmiausiai vertinome ar mūsų gautoje ląstelių populiacijoje yra dantenų mezenchiminės kilmės kamieninių ląstelių. Tuo tikslu buvo naudotas monokloninių antikūnų rinkinys prieš Stro – 1, CD19, CD44, CD45, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, skirtas mezenchiminių kamieninių ląstelių charakterizavimui. Tėkmės citometrijos duomenys, pateikti 2 lentelėje, parodė didesnę mezenchiminėms ląstelėms būdingų žymenų – CD44, CD90 ir CD166 raišką. Apie 6 proc. populiacijos buvo būdinga kamieninių ląstelių žymens – Stro – 1 raiška.

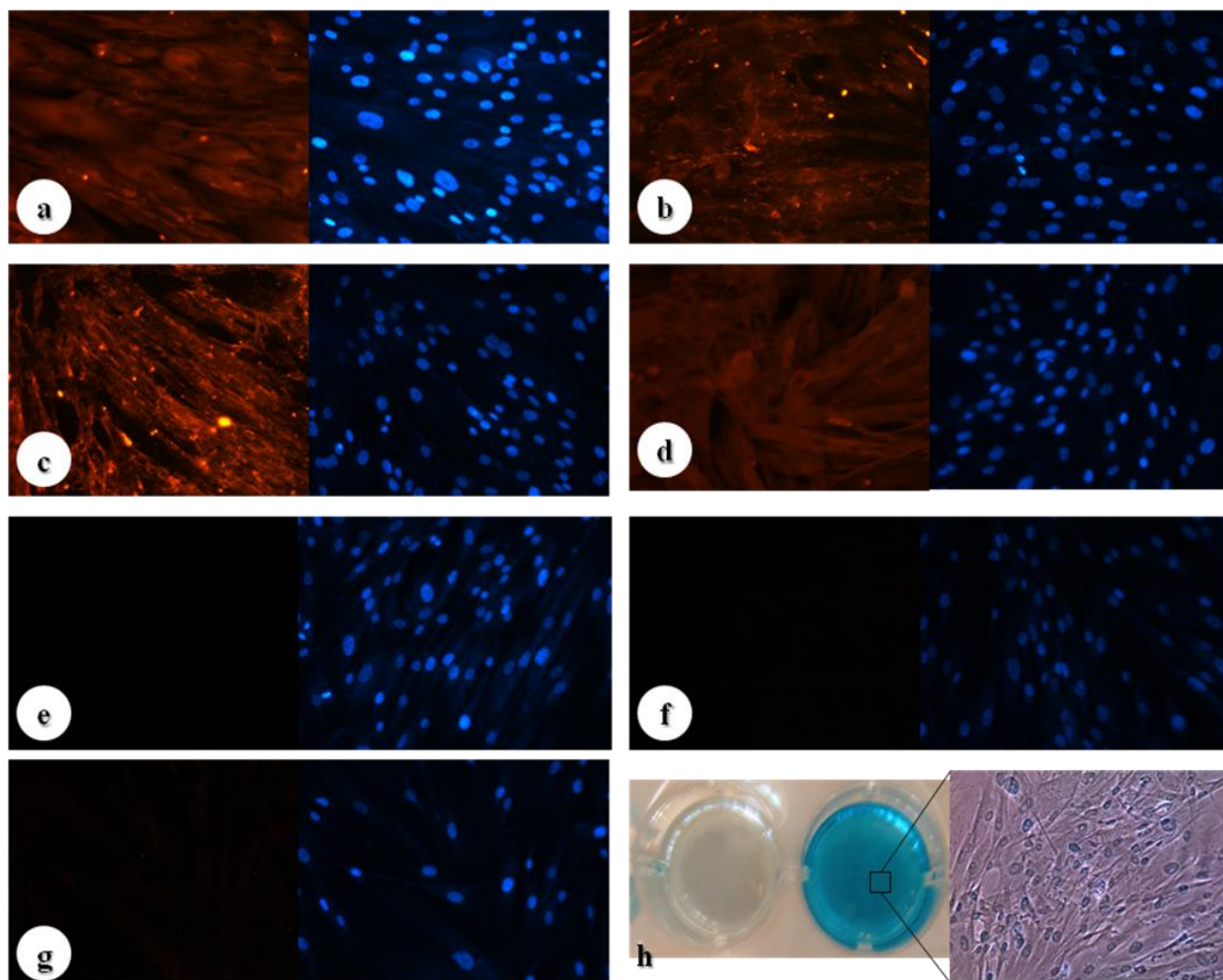
2 lentelė. Paviršiaus žymenų raiška ŽDF ląstelių populiacijoje.

Paviršiaus žymuo	Raiška, %
Stro – 1	5.7 ± 0.1
CD19	5.5 ± 0.6
CD34	5.8
CD44	16.7 ± 0.2
CD45	6.7 ± 0.9
CD90	16.4 ± 0.6
CD105	6.7 ± 0.5
CD106	7.3 ± 0.4
CD146	7.6 ± 0.7
CD166	9.7 ± 0.4

Literatūroje yra duomenų, kad žymenys CD44, CD90 ir CD166, kurių didesnę raišką mes registruojame tiriamoje ŽDF ląstelių populiacijoje, yra būdingi dantenų mezenchiminės kilmės kamieninėms ląstelėms (Tomar ir kt., 2010). Taigi, penktadalį mūsų tiriamos ląstelių populiacijos sudaro mezenchiminės kilmės kamieninės ląstelės.

Siekdami įvertinti likusią populiacijos dalį, mes pasirinkome kitą žymenų rinkinį, charakterizuojantį mezenchimines ląsteles bei fibroblastus. Šiuo atveju imunocitocheminiu analizės metodu tyrėme: (i) teigiamų mezenchiminių ląstelių žymenų – integrino $\beta 1$, kolageno, fibronektino ir vimentino raišką; (ii) neigiamų žymenų – CD14, CD45 ir CD54 raišką bei (iii) fibroblastams ir epitelinėms ląstelėms būdingo FSP – 1 baltymo raišką. Gauti duomenys pateikiami 14 paveiksle. Nustatėme, kad mūsų tiriamai ŽDF populiacijai yra būdingi

mezenchiminių ląstelių žymenys – integrinas $\beta 1$, kolagenas, fibronektinas bei vimentinas, o hepatopoetinių ląstelių žymenų – CD14, CD45 ir CD54 raiška nenustatyta.



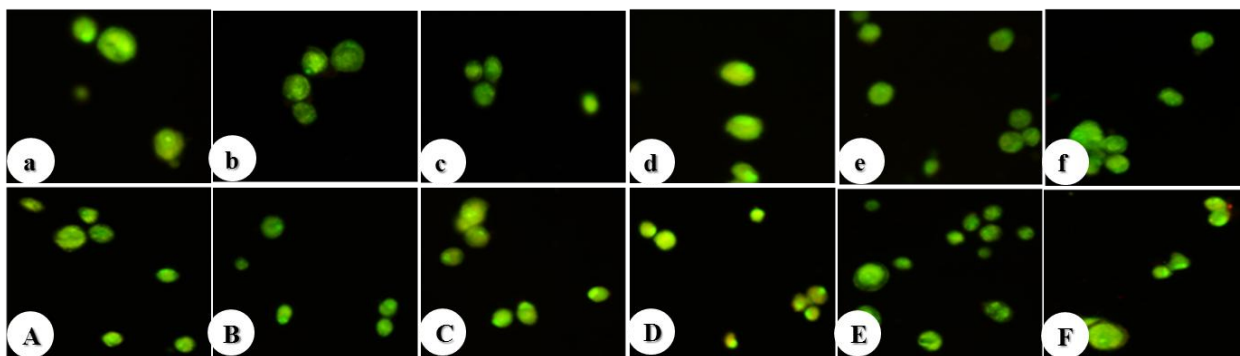
14 pav. Paviršiaus ir viduląstelių žymenų raiška ŽDF ląstelėse. Čia: kairėje pusėje: a – integrino $\beta 1$, b – kolageno, c – fibronektino, d – FSP-1, e – CD14, f – CD45, g – CD54, h – vimentino raiška; dešinėje pusėje (išskyrus h) – DAPI dažyti ląstelių branduoliai (tas pats vaizdas). h – vimentino raiškai įvertinti naudoti atitinkami antriniai antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze, substratas TMB (plačiau žr. 2.2.9. sk.)

Taigi, nustatėme, kad mūsų tiriamai ŽDF ląstelių populiacija yra mezenchiminės kilmės – jai būdingi mezenchiminių ląstelių žymenys integrinas $\beta 1$, kolagenas, fibronektinas, vimentinas. Tačiau tiriamoji populiacija yra gana heterogeniška. Joje nustatyta fibroblastams bei epitelinėms ląstelėms būdingo baltymo FSP – 1 raiška. Beto, 1/5 populiacijos sudaro ir mezenchiminės kilmės kamieninės ląstelės.

3.3. Dantenų fibroblastų sąveikos su įvairiai modifikuotais titano mėginių paviršiais tyrimas

3.3.1. Titano mėginių citotoksiškumo vertinimas

Iš literatūros žinoma, kad titanas yra biosuderinama medžiaga, atspari korozijai ir neveikianti aplinkinių audinių (Alves ir Wassall, 2009). Tačiau paviršiaus savybės gali veikti ne tik ląstelių adheziją, bet ir proliferaciją, diferenciaciją ir gyvybingumą. Žinoma, kad ląstelių adhezija vyksta dalyvaujant specializuotiems baltymų kompleksams, kurie vadinami fokaline adhezija arba sutelktiniu sąlyčiu. Šie baltymų kompleksai inicijuoja signalinius kelius reguliuojančius ląstelių savybes, tame tarpe ir žūties iniciacijos kelius (Lee ir kt., 2008). Todėl tolesnėje darbo dalyje vertinome įvairiai modifikuotų titano mėginių galimą citotoksinį poveikį ŽDF ląstelėms naudodami fluorescuojantį, su DNR besijungiantį dažų mišinį – akridino oranžinį ir etidžio bromidą (AO/EB). Ląstelių gyvybingumas buvo tiriamas po 24 ir 48 ŽDF auginimo ant titano mėginių valandų (15 pav.).



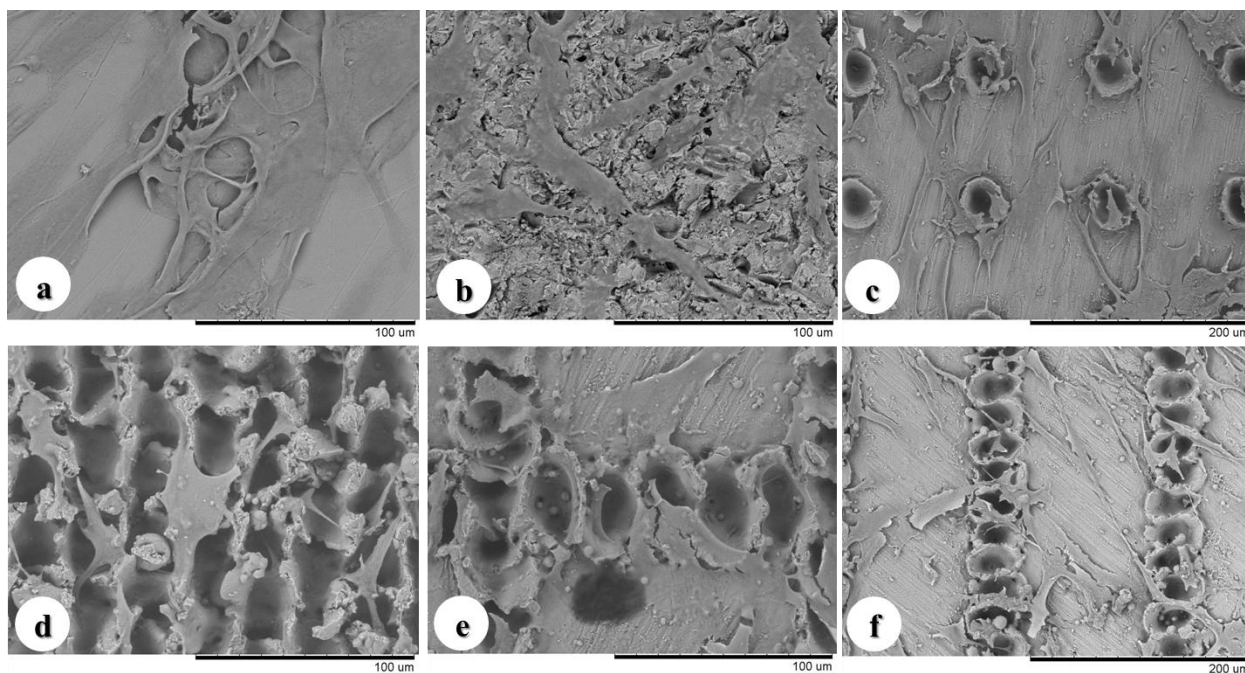
15 pav. Įvairiai modifikuotų titano mėginių citotoksiškumo ŽDF tyrimas, naudojant diferencijuotą dažymą AO/EB dažų mišiniu (x100) (žr. 2.2.5 sk.). a, b, c, d, e, f – ląstelių gyvybingumo vertinimas po 24 jų auginimo ant titano mėginių valandų. A, B, C, D, E, F – ląstelių gyvybingumo vertinimas po 48 jų auginimo ant titano mėginių valandų. Čia: a – nemodifikuotas paviršius, b – Ti paviršius, šiurkštintas smėliasrove, c – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai, d – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejęs taškai, e – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės, f – Ti modifikuotas lazeriu – linijos

Gauti duomenys 15 paveiksle pateikti duomenys rodo, kad tiriami mėginiai nėra citotoksiški. Ląstelių gyvybingumas nesiskyrė nuo kontrolės – plastiko paviršiaus, naudojamo ląstelių kultūrų auginimui *in vitro* (duomenys nepateikiami). Kokybiškai vertinant ląstelių skaičių pastebėta, kad tiek po 24 val., tiek po 48 val. daugiau ląstelių buvo 15 pav., e ir E t.y. ant lazeriu modifikuoto Ti paviršiaus, suformuojant groteles.

3.3.2. Ląstelių adhezijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršiaus analizė

3.3.2.1. Kokybinis ląstelių adhezijos vertinimas

Dantų implantų įsitvirtinimas dantenų audiniuose priklauso nuo geros ir kokybiškos biomedžiagą supančių audinių adhezijos. Paviršiaus topografija yra svarbus veiksnys lemiantis implantacijai pasirenkamų implantų bei juo supančių audinių – jungiamojo, epitelinio ir kaulinio, sąveiką (Groessner – Schreiber ir kt., 2006). Tai nulemia ląstelių morfologiją ir migraciją



16 pav. Kokybinė ląstelių adhezijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršiaus analizė SEM metodu po 24 ŽDF auginimo ant jų valandų. Čia: a – nemodifikuotas paviršius, b – Ti paviršius, šiurkštintas smėliasrove, c – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai, d – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejęs taškai, e – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės, f – Ti modifikuotas lazeriu – linijos

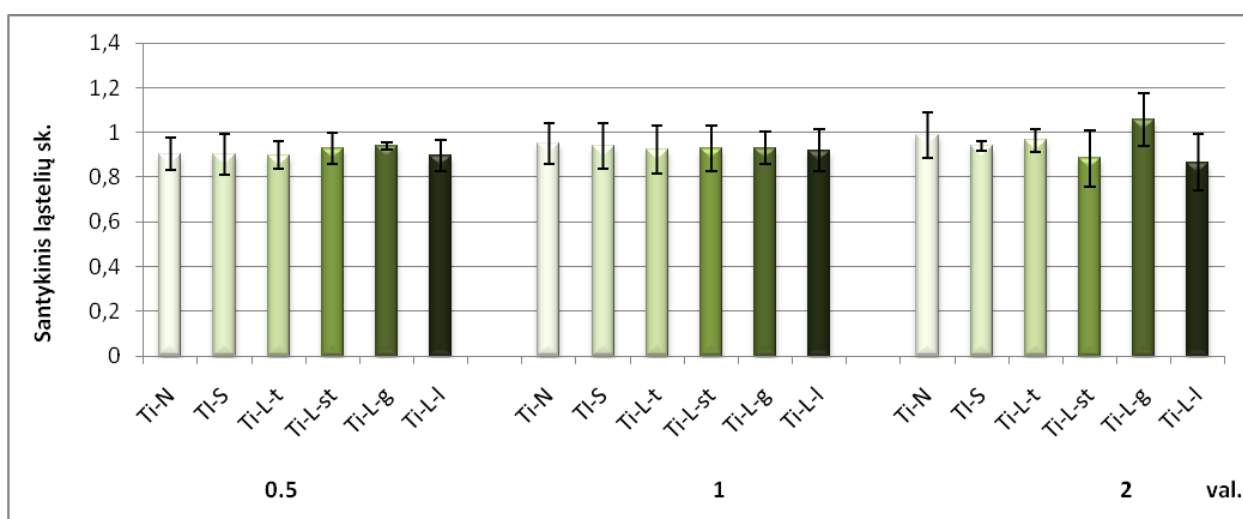
bei aktyvina signalus, atsakingus už jų proliferaciją ir diferenciaciją. O tai, savo ruožtu, užtikrina sėkmingą implantų integraciją į dantenų audinius (Reyes ir Garcia, 2003).

Taigi, tolesnėje darbo dalyje vertinome ŽDF ląstelių adheziją ant tiriamų įvairiai modifikuotų titano mėginių. Pirmiausiai SEM metodu analizavome ląstelių augimą ant tiriamų mėginių paviršiaus praėjus 24 val. po jų išsėjimo (16 pav.). Nustatėme, kad ląstelės prisitvirtino ir augo ant visų tirtų mėginių paviršiaus panašiu tankiu.

3.3.2.2. Kiekybinis ląstelių adhezijos vertinimas

SEM metodu kokybiškai palyginę ilgalaikę ŽDF ląstelių adheziją (24 val.) nustatėme, kad ląstelių tankis yra gana panašus ant visų tirtų mėginių paviršiaus. Laikoma, kad būtent greita pirminė, ląstelių adhezija yra labai svarbi jų funkcijų reguliavimui, integracijai į audinius ir net gali sumažinti implantacijos procesus lydinčią bakterinę infekciją (Anselme,

2000; Subbiahdoss ir kt., 2009). Todėl tyrėme, ar skiriasi pirminės ŽDF adhezijos greitis ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršiaus. Tuo tikslu ląstelėms buvo leidžiama prisitvirtinti prie substrato 0,5, 1 ir 2 val. Praėjus nustatytam laikotarpiui, mėginiai su ląstelėmis buvo purtomi, atkibusios/neprisitvirtinusios ląstelės buvo pašalinamos, o likęs prisitvirtinęs gyvų ląstelių kiekis buvo įvertinamas spektrofotometriškai XTT metodu. Gauti duomenys išreikšti santykinio ląstelių skaičiumi t.y. santykiu optinio tankio, išmatuotu ląstelėse augintose ant tiriamų mėginių paviršių, su optiniu tankiu išmatuotu ląstelėse, augintose ant kontrolinio plastikinio paviršiaus su optiniu tankiu (17 pav.).



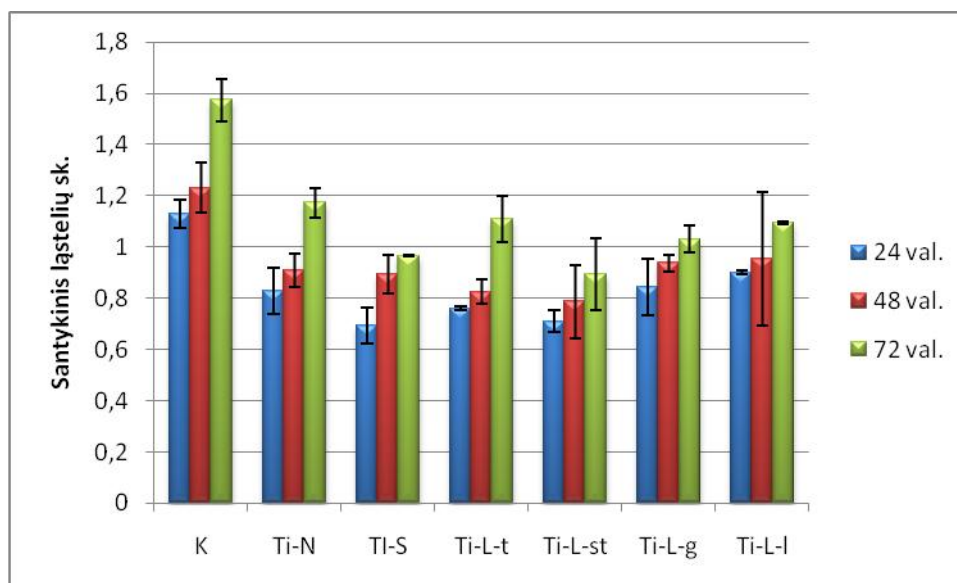
17 pav. Kiekybinis ŽDF ląstelių adhezijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršiaus vertinimas XTT metodu. Čia: Ti-N – nemodifikuotas paviršius, Ti-S – Ti paviršius, šiuurkštintas smėliasrove, Ti-L-t – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai, Ti-L-st – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejančios taškai, Ti-L-g – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės, Ti-L-l – Ti modifikuotas lazeriu – linijos. Duomenys išreikšti santykinio ląstelių skaičiumi, t.y. santykiu optinio tankio, išmatuoto ląstelėse augintose ant tiriamų mėginių paviršių su optiniu tankiu, išmatuotu ląstelėse, augintose ant kontrolinio plastikinio paviršiaus

Gauti rezultatai parodė, kad ankstyva (0,5 ir 1 val.) ŽDF ląstelių adhezija buvo gana panaši ant visų tiriamų paviršių. Tačiau po 2 val. tyrimo efektyviausias ląstelių prikibimui paviršius buvo lazeriu suformuotos grotelės. Ant šio paviršiaus nustatytas santykinis ląstelių skaičius didesnis už 1. Tai reiškia, kad šis paviršius buvo patrauklesnis ląstelių prikibimui nei kontrolinis – plastikinis paviršius. Ant minėto paviršiaus buvo stebėtas ir didesnis gyvų ląstelių skaičius, vertinant Ti mėginių citotoksiškumą (žr. 3.3.1. sk.). Tikėtina, kad tokia Ti paviršiaus modifikacija lazeriu užtikrintų geresnę implanto ir aplinkinių audinių sąveiką.

3.3.3. Dantenų fibroblastų proliferacijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių palyginimas

Ankstesnėje darbo dalyje nustatėme, kad ant daugumos tirtų įvairiai modifikuotų Ti paviršių ŽDF ląstelių adhezija yra silpnesnė nei ant kontrolinio plastiko paviršiaus. Kitų autorių yra nustatyta, kad nepaisant silpnesnės adhezijos, paviršiaus topografinės savybės gali teigiamai veikti ląstelių proliferaciją (Anselme ir kt., 2010). Šioje darbo dalyje lyginome ląstelių proliferacijos greitį ant tiriamų mėginių paviršių. ŽDF ląstelių proliferacija buvo tiriama MTT metodu. Bandymai atliekami praėjus 24, 48 ir 72 valandoms po ląstelių išsėjimo. Siekiant išvengti ląstelių sėjimo suspensijos paklaidos, gauti duomenys buvo išreiškiami santykiniais ląstelių skaičiumi t.y. santykiu ląstelių kiekiu nustatytu tiriamu momentu su ląstelių kiekiu, gautu sėjimo momentu. Iš rezultatų, pateiktų 18 paveiksle matome, kad ant visų tiriamų Ti mėginių paviršių ŽDF ląstelės proliferavo panašiu greičiu, kuris mažesnis nei ant kontrolinio – plastikinio paviršiaus augintų ląstelių (18 pav.)

Įdomu tai, kad po 72 tyrimo valandų didžiausias santykinis ląstelių skaičius pastebėtas ant nemodifikuoto titano mėginio. Gali būti, kad tokius rezultatus lėmė kitos paviršiaus savybės, pavyzdžiui krūvis ar iš terpės esančio serumo nusėdę baltymai.



18 pav. Dantenų fibroblastų proliferacijos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių palyginimas MTT metodu. Čia: K – kontrolinis plastiko paviršius, Ti-N – nemodifikuotas paviršius, Ti-S – Ti paviršius, šiurkštintas smėliasrove, Ti-L-t – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai, Ti-L-st – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejęs taškai, Ti-L-g – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės, Ti-L-l – Ti modifikuotas lazeriu, linijos. Duomenys išreikšti santykiniais ląstelių skaičiumi, t.y. santykiu ląstelių kiekiu nustatytu tiriamu momentu su ląstelių kiekiu, gautu sėjimo momentu

Tirdami ŽDF ląstelių proliferaciją, nenaudojome jokių augimą skatinančių veiksnių, o vertinome tik paviršiaus topografijos įtaką ląstelių proliferacijai. Tačiau pasaulinėje praktikoje

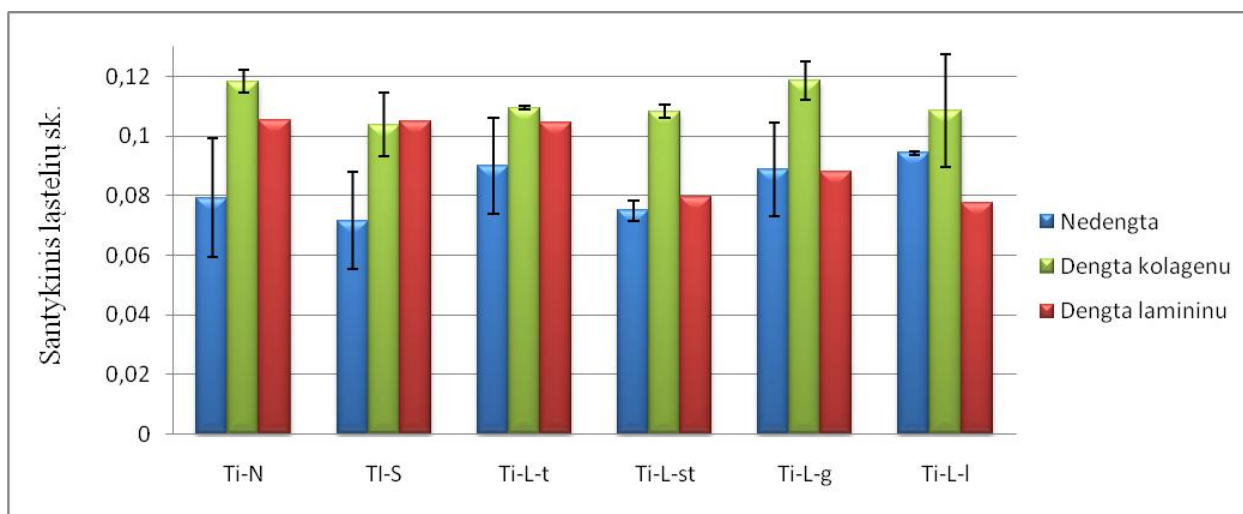
atliekant panašius tyrimus su burnos audinių kamieninėmis ląstelėmis yra tiriama įvairių augimo veiksnių – FGF, TGF – b, BMP, NGF, CTGF, vaidmuo skatinant aktyvesnį ląstelių dauginimąsi ar tam tikrų genų reguliuojančių šį procesą aktyvinimą (Bakopoulou ir kt., 2010).

3.3.4. Tarpląstelinio užpildo komponentų vaidmens tyrimas

Tyrimais nustatyta, kad titano dengimas EM komponentais gerina ląstelių adheziją ant paviršiaus, kadangi šie biologiniai komponentai svarbūs ląstelių kontaktų bei kontaktų su EM susidarymui ir palaikymui (Jonge ir kt., 2008; Demarco ir kt., 2011).

Fibroblastai gamina EM baltymą – kolageną, todėl tirtose ląstelėse – ŽDF turėtų būti ekspresuojamas šis baltymas. Lamininas yra svarbiausias pamatinės membranos komponentas, atliekantis struktūros funkciją bei veikiantis ląstelių gebėjimą diferencijuotis ir dalintis (Meredith ir kt., 1993; Lodish ir kt., 2000). Todėl tiriamų Ti paviršių padengimas šiais EM elementais galėtų pagerinti jų adheazines savybes.

EM komponentų įtaka ŽDF ląstelių adhezijai buvo tiriama įvairiai modifikuotus Ti mėginius padengiant kolagenu ir lamininu. Ląstelių adhezija/skaičius vertintas praėjus 24 val. po ŽDF ląstelių išsėjimo (19 pav.).



19 pav. Dantenų fibroblastų skaičiaus palyginimas ant įvairiai modifikuotų titano mėginių padengtų tarpląstelinio užpildo komponentais po 24 val. nuo ląstelių išsėjimo. Čia: Ti-N – nemodifikuotas paviršius, Ti-S – Ti paviršius, šiurkštintas smėliasrove, Ti-L-t – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai, Ti-L-st – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejančios taškai, Ti-L-g – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės, Ti-L-l – Ti modifikuotas lazeriu – linijos. Duomenys išreikšti santykinio ląstelių skaičiumi, t.y. santykiu ląstelių kiekio nustatyto tiriamu momentu su ląstelių kiekiu, gautu sėjimo momentu

Gauti rezultatai rodo, kad titaninių mėginių dengimas EM komponentais padidina ŽDF ląstelių adheziją/skaičių. Palyginus kolageno ir laminio poveikį ląstelių adhezijai matome, kad kolagenas efektyviau pagerino ląstelių prikibimą ant lazeriu modifikuotų Ti mėginių paviršiaus. Kai kuriais atvejais – lazeriu suformuoti susiliejančios taškai, grotelės ir linijos,

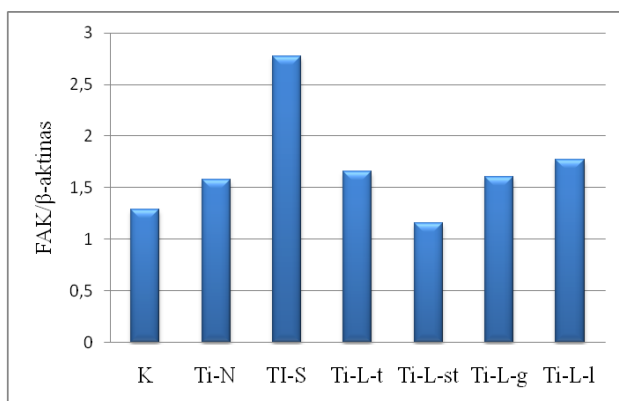
nustyta net apie 30 proc. daugiau ląstelių nei ant lamininu dengtų atitinkamų mėginių. Tačiau ryškesnio poveikio nebuvo registruota ant smėliasrove šiurkštinto paviršiaus. Tikėtina, kad Ti paviršiaus topografijos pakeitimas lazeriu pagerina baltymų adsorbciją, kuri taip pat teigiamai veikia tiriamas ląstelių savybes.

Ti paviršių galima modifikuoti ne tik padengiant pilnais EM baltymais, bet ir prijungiant EM baltymams būdingus peptidus, pavyzdžiui RGD. Nustatyta, kad taip modifikuotas paviršius padidina aplinkinių audinių adheziją, implantas geriau įsitvirtina kaule (Zhao ir kt., 2006; Pae ir kt., 2009). Atliekami tyrimai ant mėginių paviršiaus imobilizuojant EM baltymus kartu su augimo veiksniais. Nustatyta, kad toks paviršiaus pakeitimas mažina uždegiminę reakciją, skatina ląstelių dauginimąsi bei adheziją ant implanto (Pae ir kt., 2009).

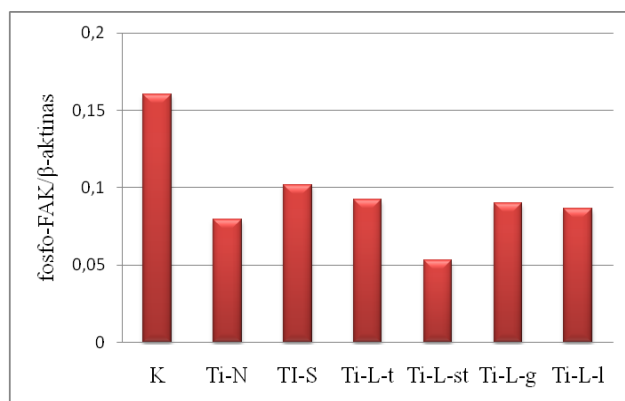
3.3.5. Signalinių molekulių raiškos/aktyvinimo tyrimas

Ląstelių sąveika su EM komponentais bei substratu yra užtikrinama susidarant fokalinei adhezijai/sutelktiniam sąlyčiui bei hemidesmosomos jungtims, kurios nulemia ląstelių savybes – morfologiją, migraciją, proliferaciją ir diferenciaciją (Reyes ir Garcia, 2003). Ląstelių adhezijos procese dalyvauja citoskeleto, integrinų šeimos baltymai bei signalo perdavime dalyvaujančios fokalinės adhezijos kinazės FAK. FAK yra atsakingos ne tik už fokalinės adhezijos formavimąsi, bet ir reguliuoja ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir kt., procesus. FAK aktyvina įvairius signalo perdavimo kelius, tarp jų ir PI3K/Akt, beveik išimtinai atsakingą už ląstelių išgyvenimą bei dalyvaujantį ląstelių diferenciacijos reguliacijoje (Lu ir kt., 2001). Todėl šioje darbo dalyje vertinome kaip kinta FAK bei Akt kinazių raiška bei jų fosforilinimas/aktyvinimas ŽDF ląstelių adhezijos ant tiriamų įvairiai modifikuotų Ti mėginių.

Pirmiausia imunofermentinės analizės ląstelių pagrindu metodu įvertinome FAK raišką ir fosforilinimo/aktyvinimo lygį ŽDF ląstelėse 24 val. augintose ant įvairiai modifikuotų Ti mėginių (20 pav.). Palyginę FAK raišką ir aktyvinimą ant smėliasrove bei lazeriu modifikuotų paviršių augintose ląstelėse, nustatėme, kad didžiausias šių signalinių molekulių lygis vienareikšmiškai buvo ant smėliasrove šiurkštinto paviršiaus – FAK raiška net du kartus buvo didesnė už kontrolinėje augintoje ant plastiko ląstelių populiacijoje nustatytą FAK baltymo lygį.



A

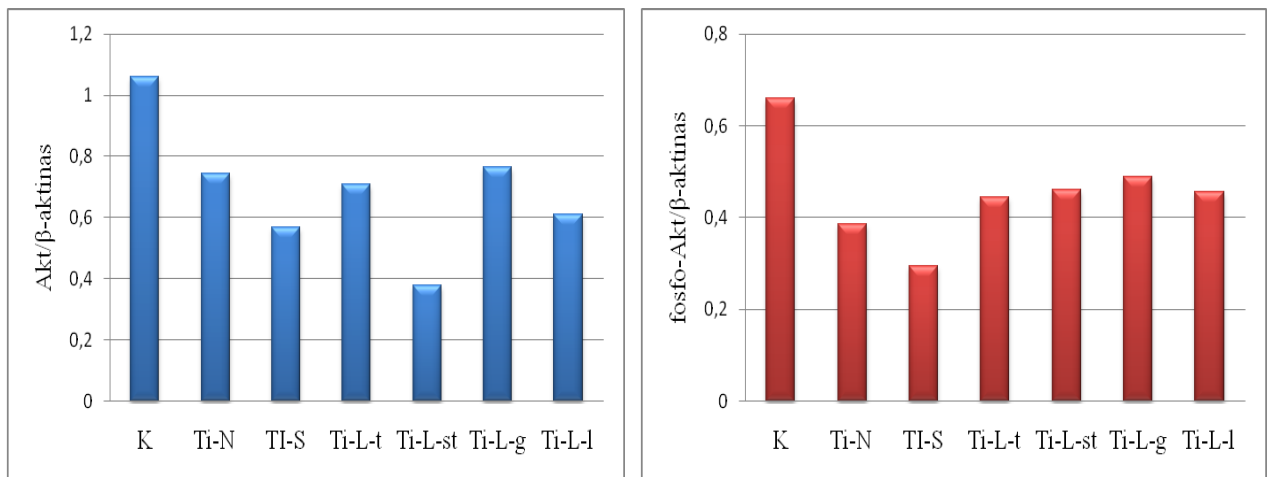


B

20 pav. FAK ir fosfo-FAK baltymų lygis dantenų fibroblastuose 24 val. augintuose ant įvairiai modifikuotų titano mėginių. Čia: Ti-N – nemodifikuotas paviršius, Ti-S – Ti paviršius, šiurkštintas smėliasrove, Ti-L-t – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai, Ti-L-st – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejančios taškai, Ti-L-g – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės, Ti-L-l – Ti modifikuotas lazeriu – linijos. Duomenys normalizuoti pagal lygiagrečiai nustatytą β-aktino baltymo kiekį

Analizuojant FAK raišką ŽDF augintuose ant lazeriu modifikuotų mėginių, ji visais atvejais taip pat buvo didesnė už kontrolinių ląstelių arba lygi (susiliejančios taškai). Guo ir kt. atliko panašius FAK raiškos aktyvinimo tyrimus ŽDF, augintuose ant tarpląstelinio užpildo (fibronektino ir I tipo kolageno). Ši mokslininkų grupė nustatė sumažintą FAK raiškos ir fosforilinimo lygį, kuris koreliavo su mažesniu p38 kinazės fosforiliniu. Tai lėmė ir sumažintą ląstelių migraciją bei adheziją. (Guo ir kt., 2011). Mūsų atveju, tiriant FAK fosforilinimo lygį taip pat stebėta didesnis fosfo – FAK baltymo lygis ant smėliasrove šiurkštinto paviršiaus. Tačiau šiuo atveju, jis buvo mažesnis nei kontrolinėje ląstelių populiacijoje.

Nustatyta, kad padidėjusi FAK raiška didina Akt baltymo lygį (Xia ir kt., 2004). Taigi, toliau tyrėme Akt signalinės molekulės raišką bei fosforilinimą. Gauti duomenys pateikiami 21 paveiksle. Šiuo atveju tiek Akt raiška, tiek Akt fosforilinimo/aktyvinimo lygis buvo žemesnis ląstelėse augintose ant tiriamų įvairiai modifikuotų Ti mėginių. Įdomu tai, kad ŽDF augintuose ant lazeriu modifikuotų paviršių Akt (išskyrus Ti-L-st) ir fosfo – Akt baltymo lygiai buvo didesni nei ant smėliasrove šiurkštintų paviršių.



A

B

21 pav. Akt ir fosfo – Akt baltymų lygis dantenų fibroblastuose 24 val. augintuose ant įvairiai modifikuotų titano mėginių. Čia: Ti-N – nemodifikuotas paviršius, Ti-S – Ti paviršius, šiurkštintas smėliarove, Ti-L-t – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai, Ti-L-st – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejęs taškai, Ti-L-g – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės, Ti-L-l – Ti modifikuotas lazeriu – linijos. Duomenys normalizuoti pagal lygiagrečiai nustatytą β – aktino baltymo kiekį

Taigi, Akt aktyvinimas, panašu, tiesiogiai nepriklauso nuo FAK raiškos. Gali būti, kad ŽDF ląstelėse, auginamose ant įvairios topografijos paviršių, Akt raiška ir fosforilimas reguliuojami ne tik β1 integrino – FAK, bet ir kitų signalinių kelių.

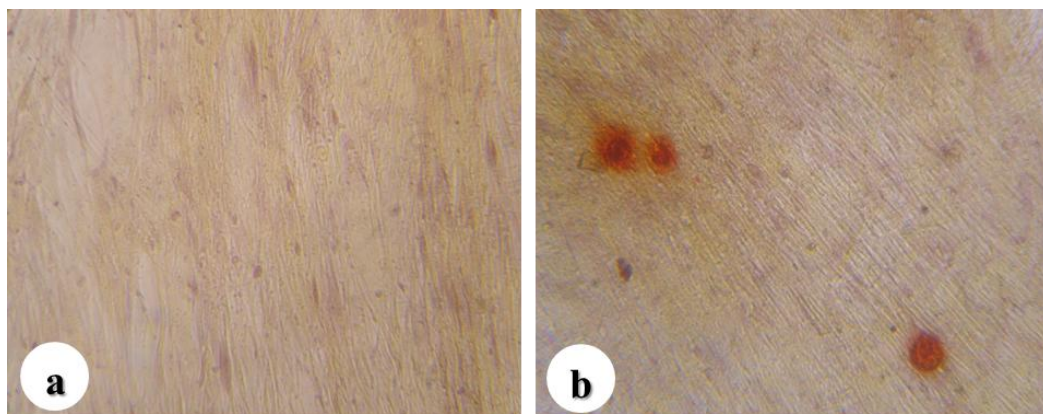
3.3.6. Osteogeninės diferenciacijos vertinimas

Iš literatūros žinoma, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės pasižymi nemažu diferenciacijos potencialu ir gali diferencijuoti į kaulines, kremzlines, raumenines, odos, sausgyslių, raiščių, ir netgi nervines ląsteles (Morscheck ir kt., 2008). Tokia jų savybė suteikia galimybę manipuluoti ląstelėmis, naudoti įvairiuose tyrimuose. Ląstelių diferenciacija į kaulinį audinį yra jau pritaikoma ir praktiškai (Anselme, 2000). Buvo nustatytas mezenchiminių ląstelių gebėjimas diferencijuotis osteogenine linkme nesant aplinkoje specifinių tokios diferenciacijos induktorių, o tik ląsteles veikiant mechaninei jėgai (Sun ir kt., 2012). Substrato paviršiaus topografija yra vienas iš mechaninės jėgos, veikiančios ląsteles, šaltinių.

Nustatėme, kad mūsų tiriamoje ląstelių populiacijoje yra ląstelių dalis, pasižyminti mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms būdingais žymenimis. Tikėtina, kad dalis ŽDF ląstelių populiacijos pasižymi tam tikru diferenciacijos potencialu. Pritaikant šiame darbe tirtas Ti mėginių paviršiaus modifikavimo strategijas praktiškai, itin aktualu būtų dalies dantenų audinyje esančių ląstelių gebėjimas diferencijuotis osteogenine linkme, nes tai padėtų stabilizuoti dantų implantą kauliniame audinyje, užtikrintų ilgalaikę ir kokybišką jo sąveiką su aplinkiniais audiniais.

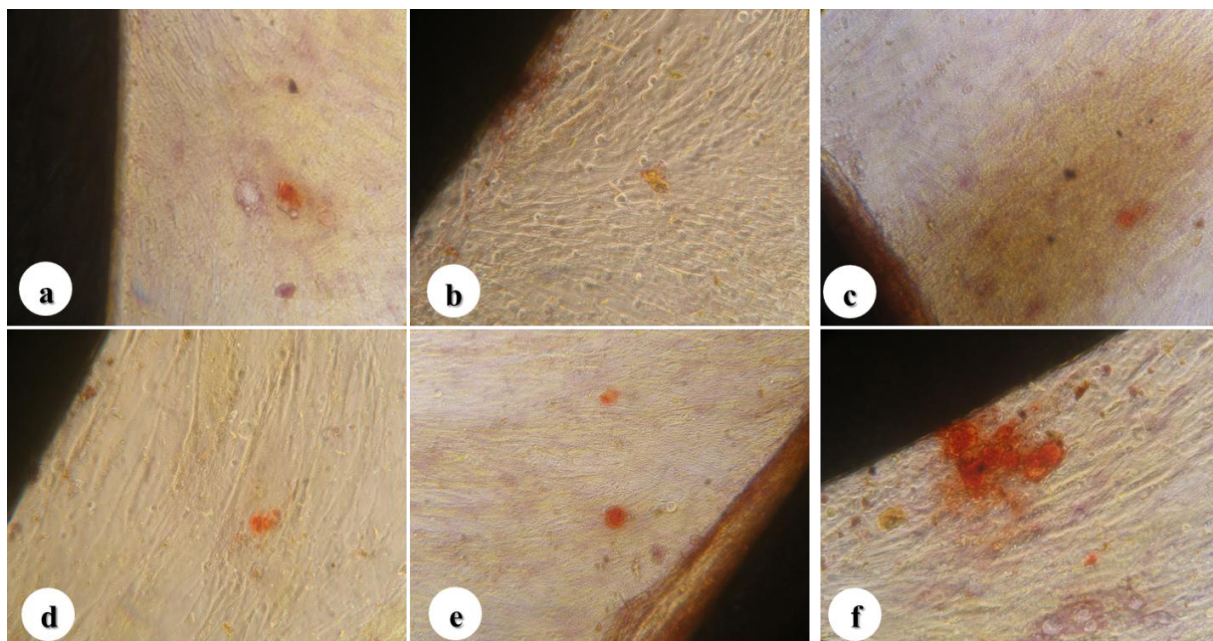
Šioje darbo dalyje vertinome Ti mėginių paviršiaus topografijos poveikį ŽDF diferenciacijai. Tiriamos ląstelės buvo augintos ant Ti mėginių specialioje diferenciacijos terpėje, kurioje buvo augimo faktorių, skatinančių ląsteles diferencijuotis osteogenine linkme.

Pirmiausia buvo įvertintas ŽDF ląstelių diferenciacijos potencialas ant kontrolinio – plastiko paviršiaus (22 pav.). Nustatėme, kad po 7 ląstelių auginimo dienų diferencijuojančioje terpėje formuojasi Ca sandėliai (nusidažiusios vietos).



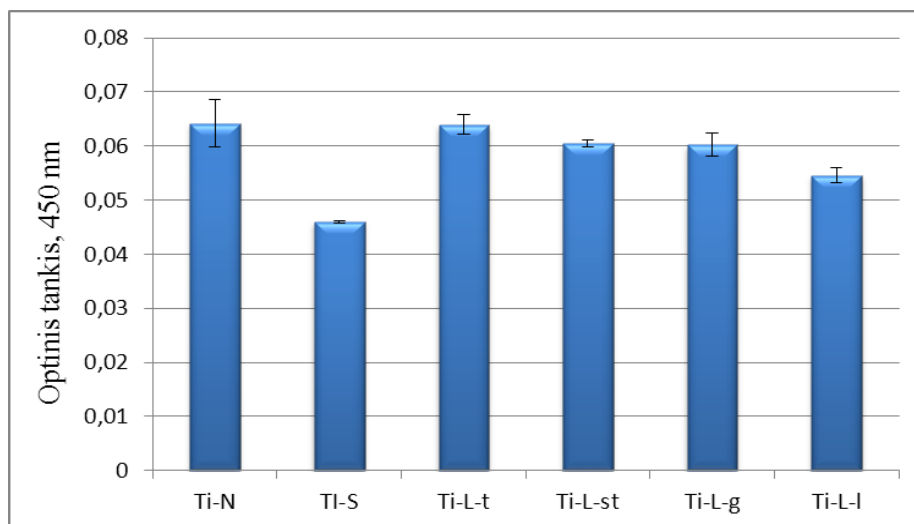
22 pav. ŽDF ląstelių diferenciacija osteogenine linkme. a – kontrolinės, nediferencijuotos ląstelės, b – 7 d. diferencijuotos osteogenine linkme ŽDF ląstelės, dažytos alizarinu S (žr. 2.2.12. sk.). Ląstelių monosluoksnio vaizdai gauti invertuotu mikroskopu: Olympus CKX41 (x200)

Toliau buvo palygintas osteogeninės diferenciacijos laipsnis ląstelėse augintose ant įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršių. Modifikuotas Ti mėginių paviršius kontaktuodamas su ląstelių monosluoksniu, gali generuoti paviršiaus topografijos nulemtas mechanines jėgas, kurios, savo ruožtu gali veikti šalia Ti mėginių esančias ląsteles. Todėl pradžioje kokybiškai vertinome osteogeninės diferenciacijos pasireiškimą ląstelėse, augančiose modifikuotų Ti mėginių aplinkoje (23 pav.). Nustatėme bendrą tendenciją – šalia Ti mėginių augančios ŽDF ląstelės geba osteogenine linkme. Pastebėta, kad daugiausia Ca sandėlių susidarė šalia lazeriu modifikuo Ti mėginio, ant kurio paviršiaus suformuotos linijos. Periferijoje tokių sandėlių stebėta mažiau.



23 pav. Ant įvairiai modifikuotų Ti karkasų augintų ŽDF ląstelių diferenciacija osteogenine linkme. Čia: a – nemodifikuotas paviršius, b – Ti paviršius, šiurkštintas smėliasrove, c – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai, d – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejančios taškai, e – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės, f – Ti modifikuotas lazeriu – linijos. Ląstelės 7 d. diferencijuotos osteogenine linkme ir dažytos alizarinu S (žr. 2.2.12. sk.) (vaizdai gauti invertuotu mikroskopu: Olympus CKX41(x200))

Kiekybiškai palyginus osteogeninės diferenciacijos laipsnį ląstelėse augintose ant įvairiai modifikuotų Ti, mažiausias jos laipsnis nustatytas ŽDF ląstelėse, augintose ant smėliasrove šiurkštinto Ti paviršiaus (24 pav.).



24 pav. Kiekybinis osteogeninės ŽDF ląstelių, augintų ant įvairiai modifikuotų Ti karkasų įvertinimas. Čia: Ti-N – nemodifikuotas paviršius, Ti-S – Ti paviršius, šiurkštintas smėliasrove, Ti-L-t – Ti modifikuotas lazeriu – atskiri taškai, Ti-L-st – Ti modifikuotas lazeriu – susiliejančios taškai, Ti-L-g – Ti modifikuotas lazeriu – grotelės, Ti-L-l – Ti modifikuotas lazeriu – linijos

Taigi, įvertinę įvairių Ti mėginių paviršiaus modifikacijų poveikį ŽDF gebėjimui diferencijuotis osteogenine linkme vienareikšmiškų rezultatų negavome. Gali būti, kad pasirinkome per trumpą diferenciacijos laikotarpį arba per mažą tirtos ŽDF populiacijos dalis pasižymi gebėjimu diferencijuotis į kaulinį audinį.

3.4. Rezultatų apibendrinimas

Pastaruoju metu daugiausia tyrimų atliekama su suaugusio organizmo mezenchiminės kilmės kamieninėmis ląstelėmis, nes jos lengvai gaunamos iš įvairių audinių, sparčiai dauginasi ląstelių kultūroje – galima greitai turėti reikiamą didelį jų kiekį, geba diferencijuotis į įvairių audinių ląsteles (kaulines, kremzlines, raumenines, riebalines, odos, sausgyslių ir raiščių ląsteles, kaulų čiulpų stromą ir net nervines ląsteles) – yra daugiagalės.

Šio darbo metu iš žmogaus dantenų subepitelinio audinio buvo išskirtos dantenų fibroblastų ląstelės. Jas charakterizavę tėkmės citometrijos bei imunocitocheminiais metodais nustatėme, kad daliai jų yra būdingi mezenchiminių ląstelių žymenys. Vėlesni tyrimai parodė, kad dalis tirtos ŽDF ląstelių populiacijos geba diferencijuotis osteogenine linkme t.y. kamieninių ląstelių savybė. Iš kitos pusės, šiai ląstelių populiacijai yra būdinga ir fibroblastų žymens – FPS-1 baltymo raiška. Taigi, mūsų tirta pirminė ląstelių linija – heterogeniška. Tačiau jos klonuoti ar atrinkti pagal specifinius tam tikrai ląstelių grupei būdingus žymenis mes neturėjome tikslo, nes burnos ertmėje dantų implantai būtent ir kontaktuoja su įvairiomis ten esančiomis ląstelėmis.

Iš literatūros žinoma, kad įvairios titano paviršiaus modifikacijos gerina minkštųjų audinių adheziją. Tyrimais nustatyta, kad ant poliruoto titano augančių ląstelių mažiau išreikšta morfologija, jų tankis mažesnis, ląstelės trumpos, ląstelių orientacijos aiški. Ant smėliasrove modifikuoto paviršiaus augančios ląstelės daugiausia yra pailgos verpstės formos, jų orientacija nėra aiški (Furuhashi ir kt., 2011). Ant lazeriu modifikuotų titano paviršių augančių ląstelių morfologija panaši kaip ir ant smėliasrove modifikuoto paviršiaus, tačiau ląstelės daugiau grupavosi ties grioveliais ar duobutėmis, jų adhezija buvo stipresnė (Sabaliauskas ir kt., neskelbti duomenys). Šiame darbe mes daugiau dėmesio skyrėme ankstyvajai 0,5, 1 ir 2 val., adhezijai, nes yra nustatyta, kad ankstyvoje adhezijos stadijoje vykstantys procesai nulemia tinkamą implanto įsitvirtinimą audiniuose. Priešingai nei tikėjomės ankstyvas 0,5 ir 1 val. adhezijos stiprumas ant modifikuotų paviršių beveik nesiskyrė nuo nemodifikuoto. Tačiau kiek vėliau, po 2 val. ant modifikuotų paviršių ląstelių prisitvirtinimas buvo stipresnis ir efektyvesnis. Modifikuoti įvairiomis kryptimis titano paviršiai nulemia ir augančių ląstelių formą, jų

orientaciją. Tai patvirtino ir mūsų rezultatai – ŽDF ląstelės augintos ant įvairiai modifikuotų titano mėginių, iš kurių efektyviausias paviršius buvo lazeriu suformuotos grotelės.

Titaninė medžiaga yra biologiškai suderinama su ląstelėmis, lengvai modifikuojama, ir net po modifikacijos nėra toksiška. Būtent tai patvirtino mūsų tyrimai. Titano paviršiai gali būti modifikuojami ne tik fizikiniais metodais, pvz., lazeriu ar smėliasrove, bet ir dengiami tarpląstelinio užpildo baltymais, prijungiant įvairias bioaktyvias molekules, suteikiant krūvį ir pan. Žinoma, kad tarpląstelinio užpildo baltymai efektyviai gerina adheziją. Mūsų tyrimai parodė, kad dengimas kolagenu ir lamininu žymiai pagerina ląstelių adheziją ant lazeriu ar smėliasrove modifikuotų paviršių.

Ląstelių adheziją, proliferaciją, diferenciaciją reguliuoja įvairūs signaliniai keliai. Šiame darbe analizavome FAK/Akt signalinio kelio vaidmenį minėtų ląstelės procesų reguliacijoje. Nustatėme, kad mūsų tirtoje sistemoje FAK raišką ženkliai aktyvino smėliasrove modifikuotas paviršius, tačiau Akt lygis buvo didesnis ant lazeriu modifikuotų paviršių. Tai rodo bendrą tendenciją – kad ląstelių adhezija ant modifikuotų paviršių stipresnė, nes fokalinės adhezijos raiška buvo didesnė ant modifikuoto paviršiaus, o tai lemia stipresnę ląstelių sąveiką tiek su mėginio paviršiumi, tiek ir tarpusavyje.

Svarbu parinkti tinkamą dantų implantų modifikacijos strategiją, kuri užtikrintų kokybišką ir ilgalaikę implanto ir jį supančių audinių sąveiką, sumažintų infekcijos ar net jo atmetimo pavojų. Todėl ląstelių adhezijos tyrimai ant įvairiai modifikuotų titano paviršių yra svarbūs praktiniu požiūriu.

IŠVADOS

- Gauta heterogeniška pirminė žmogaus dantenų fibroblastų ląstelių linija: jai būdingi mezenchiminių ląstelių žymenys (integrinas $\beta 1$, kolagenas, fibronektinas, vimentinas), fibroblastams būdingo baltymo FSP – 1 raiška, gebėjimas diferencijuotis osteogenine linkme.
- Ankstyvuojų laikotarpiu dantenų fibroblastų adhezija buvo panaši ant visų tirtų įvairiai modifikuotų titano mėginių paviršių, tačiau vėliau efektyviausias ląstelių prikibimui paviršius buvo lazeriu suformuotos grotelės.
- Ląstelių proliferacijos greitis ant visų mėginių buvo panašus, bet mažesnis nei kontrolinės populiacijos.
- FAK raiška ir fosforilinimas/aktyvinimas didžiausi buvo ląstelėse, augintose ant smėliasrove šiurkštinto paviršiaus. Tiriamoje ląstelių populiacijoje FAK raiška buvo du kartus didesnė nei kontrolinėje. Akt baltymo lygis bei jo fosforilinimas buvo didesni ląstelėse augintose ant lazeriu modifikuotų mėginių, tačiau mažesni nei kontrolinėse ląstelėse.
- Silniausiai osteogenine linkme diferencijavosi ląstelės augintos ant smėliasrove šiurkštinto titano mėginio paviršiaus.

Neringa Vičiūnaitė

.....

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abe, S.; Hamada, K.; Yamaguchi, S.; Amagasa, T.; Miura, M. 2011. Characterization of the radioresponse of human apical papilla – derived cells. *Stem cells research ant therapy* 2 (1): 1 – 10.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2002. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science. 569p.
- Alves, S. F.; Wassall, T. 2009. In vitro evaluation of osteoblastic cell adhesion on machined osseointegrated implants. *Brazilian oral research* 23(2): 131 – 136.
- Ambrose, E. J. 1961. The movements of fibrocytes. *Experimental cell research* 8: 54 – 73.
- Andersson, B.; Odman, P.; Lindvall, A. M.; Branemark, P. I. 1998. Cemented single crowns on osseointegrated implants after 5 years: Results from a prospective study on ceraone. *International journal of prosthodontics* 11 (3): 212 – 218.
- Andersson, B.; Odman, P.; Lindvall, A. M.; Lithner, B. 1995. Single – tooth restorations supported by osseointegrated implants: results and experiences from a prospective study after 2 to 3 years. *International journal of oral and maxillofacial implants* 10 (6): 702 – 711.
- Anselme, K. 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21: 667 – 681.
- Anselme, K.; Ponche, A.; Bigerelle, M. 2010. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects. *Proceedings of the institution of mechanical engineers, Part H: journal of engineering in medicine* 224: 1487 – 1507.
- Bakopoulou, A.; Leyhausen, G.; Volk, J.; Tsiftoglou, A.; Garefis, O.; Koidis, P.; Geurtsen, W. 2010. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Archives of oral biology* 7 (56): 709 – 721.
- Bauman, G. R.; Raley, J. W.; Hallmon, W. W.; Mills, M. 1993. The peri – implan sulcus. *The International journal of oral and maxillofacial implants* 8: 273 – 280.
- Baxter, L. C.; Frauchiger, V.; Textor, M.; Gwynn, I.; Richards, R. G. 2002. Fibroblast and osteblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *European cells and materials* 4: 1 – 17.
- Bluteau, G.; Luder, H. U.; Bari, C. D.; Mitsiadis, T. A. 2008. Stem cells for tooth engineering. *European cells and materials* 16: 1 – 9.
- Casagrande, L.; Cordeiro, M. M.; Nor, S. A.; Nor, J. E. 2011. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 99 (1): 1 – 7.
- Cooper, G. M. 2000. *The Cell*. Sunderland (MA): Sinauer Associates. 780p.
- Datta, H., K; Walker, J., A.; Tuck, S., P.; Varanasi, S., S. 2008. The cell biology of bone metabolism. *Clinical pathology* 61: 577 – 587.
- Davies, J. E. 2003. Understanding peri – implant endosseous healing. *Journal of dental education* 67: 932 – 949.
- Demarco, F. F.; Conde, M. C. M.; Cavalcanti, B. N.; Casagrande, L.; Sakai, V. T.; Nor, J. E. 2011. Dental Pulp Tissue Engineering. *Brazilian dental journal* 22 (11): 3 – 14.
- Duailibi, M. T.; Kulikowski, L. D.; Duailibi, S. E.; Lipay, N. M. V.; Melaragno, M. I.; Ferreira, L. M.; Vacanti, J. P.; Yelick, P. C. 2012. Cytogenic instability of dental pulp stem cell lines. *Molecular histology* 43 (1): 89 – 94.

Egusa, H.; Okita, K.; Kayashima, H.; Yu, G.; Fukuyasu, S.; Saeki, M.; Matsumoto, T.; Yamanaka, S.; Yatani, H. 2010. Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. *The Publication of peer – reviewed science* 5 (9): 1 – 12.

Elliott, W. H.; Elliott, D. C. 2009. *Biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, New York. 608p.

Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. 1998. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*: 391: 43 – 50.

Farrar, Ch.; Houser R. C.; Clarke, S. 2005. Activation of the PI3K/Akt signal transduction pathway and increased levels of insulin receptor in protein repair – deficient mice. *Aging cell* 4 (1): 1 – 12.

Franklin, R. A.; McCubrey, J. A. 2000. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia : official journal of the leukemia society of america, Leukemia research fund* 14 (12): 2019 – 2034.

Fuchs, E.; Tumber, T.; Guasch, G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116(6): 769 – 778.

Fujiseki, M.; Matsuzaka, K.; Yoshinari, M.; Shimono, M.; Inoue, T. 2003. An experimental study on the features of peri – implant epithelium: immunohistochemical and electronmicroscopic observations. *The Bulletin of tokyo dental college* 44: 185 – 199.

Furuhashi, A.; Ayukawa, Y.; Atsuta, I.; Okawachi, H.; Koyano, K. 2011. The difference of fibroblast behavior on titanium substrata with different surface characteristics. *Odontology* 07: 66 – 72.

Garcia – Echeverria, C.; Sellers, W. R. 2008. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 27: 5511 – 5526.

Geiger, B.; Bershadsky, A.; Pankov, R.; Yamada, K. M. 2001. Transmembrane extracellular matrix – cytoskeleton crosstalk. *Molecular cell biology* 2: 793 – 805.

Groessner – Schreiber, B.; Herzog, M.; Hedderich, J.; Duck, A.; Hannig, M.; Griepentrog, M. 2006. Focal adhesion contact formation by fibroblasts cultured on surface – modified dental implants: an in vitro study. *Clinical oral implants research* 17: 736 – 745.

Groessner – Schreiber, B.; Neubert, A.; Muller, W. D.; Hopp, M.; Griepentrog, M.; Lange, K. P. 2003. Fibroblast growth on surface – modified dental implants: An in vitro study. *Journal of biomedical materials research* 64: 591 – 599.

Guilem – Marti, J.; Delgado, L.; Godoy – Gallardo, M.; Pegueroles, M.; Herrero, M.; Gil, F. J. 2012. Fibroblast adhesion and activation onto micro – machined titanium surfaces. *Clinical oral implants research* 3: 1 – 11.

Guo, F.; Carter, D. E.; Mukhopadhyay, A.; Leask, A. 2011. Gingival Fibroblasts Display Reduced Adhesion and Spreading on Extracellular Matrix: A Possible Basis for Scarless Tissue Repair ? *Plos one* 6(11): 27 – 37.

Hay, E. D.; 1991. *Cell biology of extracellular matrix*. Plenum Publishing Corporation, New York. 475p.

Hamdan, M.; Blanco, L.; Khraisat A.; Tresguerres I. F. 2006. Influence of titanium surface charge on fibroblast adhesion. *Clinical implant dentistry and related research* 8 (1): 32 – 38.

Hauck, Ch. R; Hsia, D. A.; Schlaepfer, D. D. 2002. The Focal Adhesion Kinase – a regulator of cell migration and invasion. *International union of biochemistry and molecular biology* 53: 115 – 119.

- He, H.; Cao, J.; Wang, D.; Gu, B.; Guo, H.; Liu, H. 2010. Gene – modified stem cells combined with rapid prototyping techniques: a novel strategy for periodontal regeneration. *Stem cell reviews and reports* 6: 137 – 141.
- Ho, A. D.; Hoffman, R.; Zanjani, E. D. 2006. *Stem cell transplantation*. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim: Germany. 268p.
- Hu, B.; Unda, F.; Bopp – Kuchler, S.; Jimenez, L.; Wang, X. J.; Haikel, Y.; Wang, S.L.; Lesot, H. 2006. Bone marrow cells can give rise to ameloblast – like cells. *Journal of dental research* 85 (5): 416–421.
- Huamin, J.; Ci, Z.; Hui, S.; Yong, L.; Huijun, Q.; Bingyan, Z. 2002. Determination of pretransplant viability of leydig cells by MTT colorimetric assay. *Transplantation proceedings* 34: 3419 – 3421 .
- Huang, Ch. Y.; Liang, Ch. M.; Chu, Ch. L.; Liang, S. M. 2009. Albumin fibrillization induces apoptosis via integrin/FAK/Akt patway. *BMC Technology* 9 (1): 1 – 12.
- Huang, X. L.; Xu, J.; Zhang, X. H.; Qiu, B. Y.; Peng, L.; Zhang, M.; Gan, H. T. 2011. PI3K/Akt signaling pathway is involved in the pathogenesis of ulcerate colitis. *Inflammation research* 60 (8): 727 – 734.
- Yan, M.; Yu, Y.; Zhang, G.; Tang, C.; Yu, J. 2011. A journey from dental pulp stem cells to a bio – tooth. *Stem cells reviews and reports* 7 (1): 161 – 171.
- Yates, C. C.; Bodnar, R.; Wells, A. 2011. Matrix control of scarring. *Cellular and molecular life sciences* 68 (11): 1871 – 1881.
- Yen, A. H. H.; Sharpe, P. T. 2008. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell tissue research* 331: 359 – 372.
- Jansen, J. A.; de Wijn, J. R.; Wolters – Lutgerhorst, J. M.; van Mullem, P. J. 1985 Ultrastructural study of epithelial cell attachment to implant materials. *Journal of dental research* 64 (6): 891 – 896.
- Jhaveri, M. H.; Chavan, M. S.; Tomar, G. B.; Deshmukh, V. L.; Wani, M. R.; Miller, P. D. 2009. Acellular dermal matrix seeded with autologous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession: a proof-of-concept study. *Journal of periodontology* 81 (4): 616 – 625.
- Jonge, L. T.; Leeuwenburgh, S. C. G.; Wolke, J. G. C.; Jansen, J. A. 2008. Organic – inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharmaceutical research* 25 (10): 2357 – 2369.
- Kerr, J. F.; Wyllie, A .H.; Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26 (4): 239 – 57.
- Kimura, T.; Nakano, T. 2009. Regulation of stem cell systems by PI3K/Akt signaling. *Regulatory networks in stem cells* 4: 309 – 318.
- Krauss, G. 2008. *Biochemistry of signal transduction and regulation*. WILEY – VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim: Germany. 646p.
- Kumar, S. 1998. *Apoptosis: mechanisms and role in disease*. WILEY – VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim: Germany. 259p.
- Kuroda, Y., Kitada, M.; Wakao, S.; Nishikawa, K.; Tanimura, Y.; Makinoshima, H.; Goda, M.; Akashi, H.; Inutsuka, A.; Niwa, A.; Shigemoto, T.; Nabeshima, Y.; Nakahata, T.; Fujiyoshi, Y.; Dezawa, M. 2010. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the national academy of sciences* 107 (19): 8639 – 8643.

- Lavenus, S.; Berreur, M.; Trichet, V.; Pilet, P.; Louarn, G.; Layrolle, P. 2011. Adhesion and osteointegration of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores. *European cells and materials* 22: 84 – 96.
- Lee, J.; Kang, B. S.; Hicks, B.; Chancellor, T. F. Jr.; Chu, B. H.; Wang, H. – T., Keselowsky, B. G.; Rena, F.; Lele, T. P. 2008. The control of cell adhesion and viability by zinc oxide nanorods. *Biomaterials* 29: 3743 – 3749.
- Lindroos, B.; Maenpaa, K.; Ylikomi, T.; Oja, H.; Suuronen, R.; Miettinen, S. 2008. Characterization of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 368: 329 – 335.
- Lobregt, S.; Vuurberg, T.; Schillings, V. V. 2001. Dental implant planning in easy vision. *Lecture notes in computer science* 2208: 1261 – 1262.
- Locke, M.; Windsor, J.; Dunbar, P.R. 2009. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ journal of surgery* 79 (4): 235 – 244.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. 2000. *Molecular cell biology*. New York: W. H. Freeman. 673p.
- Lu, Z.; Jiang, G.; Blume – Jensen, P.; Hunter, T. 2001. Epiderman growth factor – induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Molecular and cellular biology* 21 (12): 4016 – 4031.
- Mackenzie, I. C.; Tonetti, M. S. 1995. Formation of normal gingival epithelial phenotypes around osseo – integrated oral implants in humans. *Journal of periodontology* 66 (11): 933 – 943.
- Majno, G.; Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*: 146: 3 – 15.
- Marchetti, C.; Farina, A.; Cornaglia, A. I. 2002. Microscopic, immunocytochemical, and ultrastructural properties of peri – implant mucosa in humans. *Journal of periodontology* 73 (5): 555 – 563.
- Marco, F.; Milena, F.; Gianluca, G.; Vittoria, O. 2005. Periimplant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron* 36: 630 – 644.
- McGuire, M. K.; Nunn, M. E. 2005. Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue-engineered human fibroblast – derived dermal substitute. I. Comparison to the gingival autograft: a randomized controlled pilot study. *Journal of periodontology* 76 (6): 867 – 880.
- Melcher, A. H. 1985. Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *he Annals of the royal college of surgeons of England* 67: 130–131.
- Mercille, S.; Massie, B. 1994. Induction of apoptosis in nutrient – deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnology and bioengineering* 44(9): 1140 – 1154.
- Meredith, J. E.; Fazeli, B.; Schwartz M. S. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Molecular biology of the cell* 4: 953 – 961.
- Mildažienė, V.; Jarmalaitė S.; Daugelavičius, R. 2004. *Ląstelės biologija*. Kaunas: Vytauto Didžiojo universitetas. 382p.
- Moon, I. S.; Berglundh, T.; Abrahamsson, I.; Linder, E.; Lindhe, J. 1999. The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. *Journal of clinical periodontology* 26: 658 – 663.
- Morscheck, C.; Schmalz, G.; Reichert, T. E.; Vollner, F.; Galler, K.; Driemel, O. 2008. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical oral investigations* 12: 113 – 118.

- Nair, P. N. R. 2006. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International endodontic journal*, 39: 249 – 281.
- Nebe, J. G. B.; Luethen, F.; Lange, R.; Beck, U. 2007. Interface interactions of osteoblasts with structured titanium and the correlation between physicochemical characteristics and cell biological parameters. *Macromolecular journals* 7: 567 – 578.
- Nyashin, Y. I.; Nyashin, M. Y. 2000. Biochemical modelling of periodontal ligament behaviour under mechanical loads. *Acta of Bioengineering and biomechanics* 2 (2): 67 – 74 .
- Osaki, M.; Oshimura, M.; Ito, H. 2004. PI3K – Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9 (6): 667 – 676.
- Oswal, S.; Ravindra, S.; Sanivarapu, S. 2011. Stem cells in periodontics. A futuristic reality. *Stomatology and occlusion medicine* 4: 95 – 104.
- Owen, G. R.; Meredith, D. O.; Gwynn, I.; Richards, R. G. 2005. Focal adhesion quantification – a new assay of material biocompatibility. *European cells and materials* 9: 85 – 96.
- Pae, A.; Lee, H.; Kim, H. S.; Kwon, Y. D.; Woo, Y. H. 2009. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomedical materials* 4: 1 – 7.
- Paratore, Ch.; Sommer, L.; Unsicker, K.; Krieglstein, K. 2006. *Stem cells. In: Cell signaling and growth factors in development*. WILEY – VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim: Germany. 300 p.
- Parsons, J. T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of cell science* 116: 1409 – 1416.
- Parsons, J.T.; Martin, K. H.; Slack, J. K.; Taylor, J. M.; Weed S. A. 2000. Focal Adhesion Kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 19 (49): 5606 – 5613.
- Patel, R. K.; Mohan, C. 2005. PI3K/Akt signaling and systemic autoimmunity. *Immunologic research* 31 (1): 47 – 55.
- Peltola, T.; Jokinen, M.; Rahiala, H.; Patsi, M.; Heikkila, J.; Kangasniemi, I.; Yli – Urpo, A. 2000. Effect of aging time of sol on structure and *in vitro* calcium phosphate formation of sol–gel derived titania films. *Journal of biomedical materials research* 51: 200 – 208.
- Platt, M., O.; Wilder, C., L.; Wells, A.; Griffith, G., L.; Lauffenburger, D.; A. 2009. Multipathway kinase signatures of multipotent stromal cells are predictive for osteogenic differentiation. *Stem cells* 27(11): 2804 – 2814.
- Probst, J. 2009. Implants and prostheses. *Technology guide* 5: 196 – 201.
- Reyes, C. D.; Garcia, A. J. 2003. A centrifugation cell adhesion assay for high-throughput screening of biomaterial surfaces. *Journal of biomedical materials research part: A*. 67 (1): 328 – 333.
- Rybakov, A. I.; Kulikova, V. S.; Terechova, N. V. 1975. General factors in the pathogenesis of parodontosis and chronic recurring aphthous stomatitis. *Zentralblatt* 63: 435 – 441.
- Rossi, S.; Moritz, N.; Tirri, T.; Peltola, T.; Areva, S.; Jokinen, M.; Happonen, R. P.; Narhi, T. 2007. Comparison between sol – gel – derived anatase – and rutile – structured TiO₂ coatings in soft tissue environment. *Journal of biomedical materials research* 82: 965 – 974.
- Saczko, J.; Dominiak, M.; Kulbacka, J.; Chwikowska, A.; Krawczykowska, H. 2008. A simple and established method of tissue culture of human gingival fibroblasts for gingival augmentation. *Folia histochemica et cytobiologica* 46: 117 – 119.

- Schroeder, H. E.; Münzel – Pedrazzoli, S.; Page, R. 1973. Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Archives of oral biology* 18: 899 – 923.
- Schultz, G. S.; Wysocki, A. 2009. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *The wound healing society and the European tissue repair society* 17: 153 – 162.
- Seglen, P. O. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in cell biology* 13: 29 – 83.
- Shultz, E. 1996. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Developmental biology* 175: 84 – 94.
- Shuttleworth, C. A.; Berry, L.; Wilson, N. 1980. Collagen synthesis in rabbit dental pulp fibroblast cultures. *Archives of oral biology* 25: 201 – 205.
- Silverio, K. G.; Benatti, B. B.; Casati, M. Z.; Sallum, E. A.; Nociti, F. H. 2008. Stem cells: potential therapeutics for periodontal regeneration. *Stem cell reviews* 4: 13 – 19.
- Siminovitch, L.; McCulloch, E. A.; Till, J. E. 1963. The distribution of colony – forming cells among spleen colonies. *Journal of cellular physiology* 62 (3): 327 – 336.
- Subbiahdoss, G.; Kuijter, R.; Grijpma, D. W.; Van der Mei, H. C.; Busscher, H. J. 2009. Microbial biofilm growth vs. tissue integration: “the race for the surface” experimentally studied. *Acta Biomaterialia* 5: 1399 – 1404.
- Suk – Won, L.; Su – Yeon, K.; In – Chul, R.; Won – Yoon, Ch.; Leesungbok, R.; Keun – Woo, L. 2009. Influence of microgroove dimension on cell behavior of human gingival fibroblasts cultured on titanium substrata. *Clinical oral implants research* 20: 56 – 66.
- Sun, Y.; Chen, C. S.; Fu, J. 2012. Forcing stem cells to behave: a biophysical perspective of the cellular microenvironment. *Annual Review Biophysics* 41: 519 – 542.
- Tomar, G. B.; Srivastava, R. K.; Gupta, N.; Barhanpurkar, A. P.; Pote, S. T.; Jhaveri, H. M.; Mishra, G. C.; Wani, M. R. 2010. Human gingival – derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow – derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochemical and biophysical research communications* 393: 377 – 383.
- Wulf, G. G.; Jackson, K., A.; Goodel, M., A. 2001. Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Experimental Hematology* 29(12): 1361 – 1370.
- Xia, H.; Nho, R. S.; Kahm, J.; Kleidon, J.; Henke, C. A. 2004. Focal Adhesion Kinase is upstream of phosphatidylinositol 3 – kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a $\beta 1$ integrin viability signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 279 (31): 33024 – 33034.
- Zhang, J.; Li, L. 2005. BMP signaling and stem cell regulation. *Developmental Biology* 284(1): 1 – 11.
- Zhao, B.; Yi, Z.; Lu, Z.; Tian, W.; Cui, F.; Feng, H.; Hu, H.; Kawakami, T.; Takagi, T.; Nagai, N. 2006. Improvement of adhesion and spreading of human gingival fibroblasts to RGD – grafted titanium surface. *Journal of hard tissue biology* 15 (2): 65 – 68.
- Zuk, P. A. 2010. The Adipose – derived stem cell: looking back and looking ahead. *Molecular biology of the cell* 04 (4): 89 – 95.

Internetinės nuorodos

Priedančio audiniai ir pagrindinės danties dalys [interaktyvus] [žiūrėta 2012 – 03 – 19]. Prieiga per internetą: <http://www.shands.org/health/In-depth%20Reports/10/000024.htm>

Tarpląstelinio užpildo ir ląstelės sąveika [interaktyvus] [žiūrėta 2012 – 04 – 04]. Prieiga per internetą: http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2textbook/extracellmatrix.html

Kolageno gijos ir skaidulos jungiamajame audinyje [interaktyvus] [žiūrėta 2012 – 05– 11]. Prieiga per internetą: <http://thegist.dermagist.com/wp-content/uploads/2011/01/collagen.jpg>

PADĖKA

Noriu padėkoti Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Vivariumo skyriaus darbuotojoms: dr. Virginijai Bukelskienei, Audronei Packevičienei, kurios magistratūros studijų metu padėjo man kryptingai mokytis ir gilinti žinias, rengiant magistrinį darbą; kolegai Evaldui Balčiūnui už pagalbą atliekant SEM tyrimus.

Tačiau labiausiai noriu padėkoti savo magistrinio darbo vadovei dr. Daivai Baltriukienei už išsakytas mintis ir reikšmingas pastabas, taip pat skatinimą ir rėmimą, bei didžiulę pagalbą rašant baigiamąjį magistrinių studijų darbą.

Darbas rengtas dalyvaujant LMT finansuojamo mokslininkų grupių projekto „Dantenu fibroblastų adhezijos ypatumų ir jų panaudojimo minkštųjų audinių regeneracijai tyrimas“, reg. Nr. MIP-11369.