

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. ПАРАСКЕВ  
СТОЯНОВ” - ГР. ВАРНА**

**ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА**

**КАТЕДРА ПО АНАТОМИЯ И КЛЕТЪЧНА БИОЛОГИЯ**

**Д-р Боян Димитров Първанов**

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА  
ПРОГЕНИТОРНИ КЛЕТКИ ПО ВРЕМЕ НА  
ПРЕНАТАЛНОТО РАЗВИТИЕ НА ЗЪБ ПРИ ЧОВЕК**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд**

**за присъждане на образователна и научна степен**

**ДОКТОР**

**Докторска програма:**

**„Анатомия, хистология и цитология”**

**Направление 7.1 Медицина**

**Научен ръководител:**

**Проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н.**

**Варна, 2024 г.**

Дисертационният труд е оформен върху 106 стандартни машинописни страници. Литературният обзор е подкрепен от 12 фигури. Резултатите са подкрепени от 76 фигури. В дисертационния труд са използвани 59 литературни източника, от които 55 на латиница и 4 на български език.

Научното жури предлага дата за провеждане на заключителното си заседание на 27. 03. 2024 г. във виртуална зала на електронната платформа Webex към Медицински университет – Варна

#### **Външни членове:**

1. Проф. д-р Николай Еленков Лазаров, д.м.н. – хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – София
2. Доц. д-р Милка Христова Габровска-Роева, д.м. - хабилитирана в професионално направление 7.1. Медицина, гр. Варна
3. Доц. д-р Георги Ников Чалдъков, д.м. - хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, гр. Варна

#### **Вътрешни членове:**

1. Проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н. - хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – Варна

2. Доц. д-р Стоян Павлов Павлов, д.м. - хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – Варна

**Резервен външен член**

Доц. д-р Николай Димитров Димитров, д.м. - хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, Тракийски университет – Стара Загора

**Резервен вътрешен член:**

Проф. д-р Ваня Горанова Стефоска, д.м. - хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – Варна

## Съдържание

1. Използвани съкращения.....	5
2. Увод.....	6
3. Цел.....	8
4. Задачи .....	8
5. Материали и методи.....	9
5.1. Субекти на изследване.....	9
5.2. Обработка на тъканите.....	9
5.3. Имунохистохимични методи.....	11
5.4. Анализ на препаратите.....	12
5.5 Статистически анализ.....	12
6. Резултати.....	14
6.1. Оцветяване с хематоксилин и еозин.....	14
6.2. Имунохистохимично изследване с маркер за Ki67.....	17
6.3. Имунохистохимично изследване с маркер за CD34.....	22
6.4. Имунохистохимично изследване с маркер за GFAP.....	26
6.5. Имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16.....	28
6.6 Имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20.....	43
6.7 Сравнение между ZBTB16 и ZBTB20.....	61
7. Дискусия.....	78
8. Заключение.....	86
9. Изводи.....	87
10. Справка за приноса на дисертационния труд.....	89
11. Публикации и доклади във връзка с дисертационния труд.....	90
12. Благодарности.....	91

## **1.Използвани съкращения**

BMP - Bone morphogenetic protein

FGFs - fibroblast growth factors

SHH - sonic hedgehog

HOX – Homeobox

PAX – paired box protein

WNT – wingless-related integration site

OTX - orthodenticle homolog

MSX – muscle segment homeobox

EPH - ephrin

DPSC – Dental pulp stem cells

VEGFR – Vascular endothelial growth factor receptor

HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells

BMSC – Bone marrow stem cells

GFP – green fluorescent protein

ZBTB16 - zinc finger and broad complex tramtrack bric-a-brac domain-containing 16

ZBTB20 - zinc finger and broad complex tramtrack bric-a-brac domain-containing 20

## 2. Увод

Необходимостта от познаване на най-важните етапи от развитието и растежа на лицевия скелет е тясно свързано с диагностиката и определянето на прогнозата и плана на лечение при ЗЧД. Много често познаването на растежните механизми и съобразяването с тях има решаващо значение за предпазването от тежки патологични отклонения (Мутафчиев, 2003).

Развитието на организма от момента на оплождането до раждането протича в два основни етапа: ембриогенеза до 3-ти ембрионален месец и фетогенеза от 3-ти ембрионален месец до раждането. Развитието на лицето става от четвъртата до седмата седмица. Мезенхимът за развитието на лицево-челюстната област произлиза от параксиалния и латерален мезодерм, невралния гребен и задебелени региони от ектодермата, известни като ектодермални плакоди (Enlow, Hans 1996).

Параксиалната мезодерма (сомити и соматомери) формира голяма част от мембранозните и хрущялни компоненти на неврокраниума, всички волеви мускули на кранио-фациалния регион, дермата и съединителната тъкан в дорзалния регион на главата и менингите каудално от прозенцефалон. Латералната пластинка от мезодермата формира ларингеалните хрущяли (пръстеневиден и пирамиден) и съединителната тъкан в региона. Клетките на невралния гребен произлизат в регионите на невроектодерма на предния мозък, средния мозък и ромбовидния мозък, и мигрират вентрално във фарингеалните арки и роstralно около предния мозък и оптичната чашка в лицевия регион. В тези области те формират целия висцерокраниум (лице) и части от мембранозните и хрущялните региони на неврокраниума (черепа). Те също формират всички други тъкани в тези региони, включително хрущял, кост,

дентин, сухожилия, дерма, мека и паяжиновидна мозъчни обвивки, сетивни неврони и жлезна съединителна тъкан (Avery, Mosby 2006)

Клетки от ектодермалните плакоди (епифарингеалните плакоди) заедно с невралния гребен формират неврони от 5-ти, 7-ми, 9-ти и 10-ти краниални сетивни ганглии (Avery, Mosby 2006).

За формирането на устната кухина и лицето непосредствено значение имат хрилните дъги, които са образувания характерни за ранните стадии на зародиша (четвърта-пета седмица). Тези дъги са чифтни, симетрични образувания. Устната кухина на зародиша е заградена от производни на първата висцерална дъга: отдолу от двата долночелюстни израстъка, и отстрани – от двата горночелюстни израстъка. От горната страна на устната ямка надвисва нечифтното фронтонезално възвишение, което израства от предния край на черепната основа.

Зъбите се развиват от зачатъци, които произлизат от ектодермата и мезенхма. Първите признаци на развитие на зъбите се появяват към средата на 2-ри ембрионален месец (В. Ванков, Вл. Овчаров, 2008).

В настоящото изследване анализираме тъкани от зъбни зачатъци на различни стадии на развитие с цел да установим специфични характеристики на експресията на два транскрипционни фактора, ZBTB16 и ZBTB20, в прогениторни и диференцирани клетки от развиващата се зъбна тъкан.

### **3. Цел:**

Изследване на зони на човешки зъбни зародиши и откриване на взаимоотношения между транскрипционните фактори ZBTB16 и ZBTB20.

### **4. Задачи:**

1. Получаване на тъкани от човешки ембрионални челюсти
2. Фиксация и хистологична обработка на тъканите за имунохистохимичен анализ.
3. Осъществяване на хистохимични и имунохистохимични оцветявания за съдови маркери.
4. Осъществяване на имунохистохимични оцветявания за пролифериращи клетки и ангиогенни фактори в зъбен зародиш по време на развитието.
5. Количествен и фенотипен анализ на клетките, позитивни за изследваните маркери.



## **5. Материали и методи**

### **5.1. Субекти на изследване**

Изследвани бяха човешки ембриони и фетуси на възраст от 4 до 36 гестационни седмици (г.с.). За проучването се одобряват мъртви, спонтанно абортирани ембриони и плодове, както и изкуствено предизвикани аборти по медицински показания. Не е включен материал от аборти по желание.

Тъканен материал от ембриони и фетуси след спонтанни аборти преди 22 г.с. е взет след приключване на аборта и след получаване на писмено съгласие от майката (пациента). Тъканен материал от мъртъв плод след 22 г.с. е взет по време на аутопсия след получаване на писмено съгласие от майката (пациента).

Този научен проект е одобрен от Комисията по етика на научните изследвания при МУ „Проф. Д-р П. Стоянов”, Варна с протокол-решение №19 от 05.04.2012 г.

Бяха изследвани 50 зъбни зародиша от различни зъбни групи.

### **5.2. Обработка на тъканите**

Декалцинация с 25% разтвор на ЕДТА (Комплексон 3)  
(подготовка на разтвора)

1. 250г. ЕДТА(Комплексон 3) се разтварят в 200 мл вода, нагрява се без кипене (магнитна бъркалка)
2. Добавят се 50 мл. 40% разтвор на NaOH (40г. NaOH + 100 мл. вода)
3. Долива се вода до 1 литър

4. До пълното разтваряне на комплексона се налива NaOH
5. Пехаметрира се до рН 7,6 – 7,9 ( след като изстива разтвора)

I-ви тип декалцинация (бавна)

Материалът се поставя в 50 мл. декалцинираща течност, която се сменя всеки ден до завършване на декалцинацията.

II-ри тип декалцинация (ускорена)

Микровълновата печка се загрява предварително с 150 мл. вода за 2 мин. на 400W. Водата се сменя със студена и се нагрива за 1 мин. на 400W. Материалът се поставя в огнеупорен съд с декалциниращата течност. Нагрятата вода и декалциниращата течност се поставят диаметрално в MW и се нагриват за 30 сек. на 400W. Остава се в MW. Процедурата се повтаря 5-8 пъти на ден (средно 6 пъти)

Тест за декалцинация

Реактив 1 – 5% амониев хидроксид (25% амониев хидроксид + 95 мл. вода)

Реактив 2 – 5% амониев оксалат (5гр. амониев оксалат + 100 мл. вода)

Равни части от реактив 1 и реактив 2 се смесват (по 10 мл.)

Тест:

5 мл. от декалциращата течност (която е ползвана) + 10 мл. от реактива се смесват в епруветка и се разбъркват, оставят се за цяла нощ. Ако в разтвора има калции се образува преципитат.

### **5.3. Имунохистохимични методи**

След декалцинацията на ембрионалните челюсти, изготвихме препарати от зъбни зародиши, които оцветихме по различни методи.

#### **Протокол: ZBTV16/ZBTV20/CD34/GFAP/Ki67**

Парафинови препарати срязани на 4  $\mu\text{m}$  ма микротом

1. Депарафиниране до дест.вода, TBS
2. Антигенно възстановяване – цитрат (pH 6) – PT Link – 2 x 20 min.  $97^{\circ}\text{C} \rightarrow 65^{\circ}\text{C}$
3. Измиване в TBS – 10 min/RT
4. Пероксидазно блокиран реагент ДАКО – 10 мин. / $37^{\circ}\text{C}$
5. TBS 3 x 10 min.
6. Инкубация на първичното антитяло –  $4^{\circ}\text{C}$ / 96 h

rb ZBTV16 разреждане 1:100 в разтворител TBS (Sigma HPA001499)

rb ZBTV20 разреждане 1:50 в разтворител TBS (Sigma HPA016815)

rb GFAP разреждане 1:400 в разтворител TBS (DAKO z0334)

mo Ki67 готов за употреба (DAKO IR626)

mo CD34 готов за употреба (DAKO IR632)

7. Измиване в TBS – 3 x 10 min/RT
8. Инкубация на вторичното антитяло – HRP (Horseradish peroxidase) DAKO готов за употреба – 2 часа/RT
9. Измиване в TBS – 3 x 10 min/RT
10. DAB+хромоген: – 10 min. /RT
11. Измиване в TBS – 3 x 10 min
12. Хематоксилин 1 min.
13. Дестилирана вода
14. Покриване

#### **5.4. Анализ на препаратите**

Анализът на препаратите беше осъществен с микроскоп Axio Imager.72 Zeiss. С помощта на камера AxioCam MRc и система AxioVisioner в дигитални рамки в различни участъци бяха преброени маркираните клетки и разпределени в групи според експресията на транскрипционни фактори.

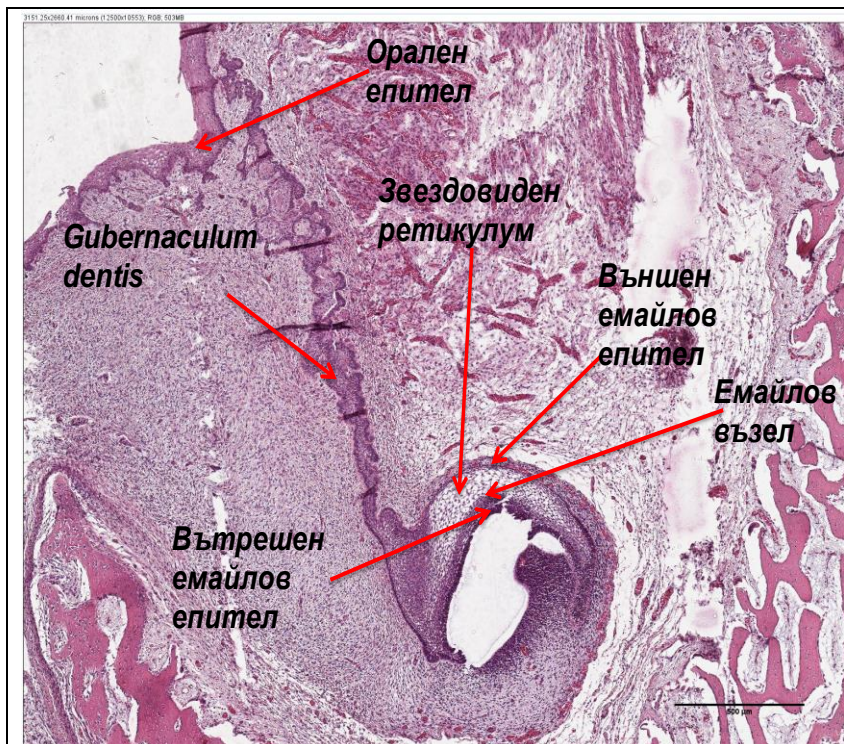
#### **5.5 Статистическа обработка**

Ръчно изброените стойности бяха въведени в стандартни .xlsx таблици. Обработването и сортирането на данните беше направено в .xlsx, а за статистическия анализ и за направата на графиките беше използван R. „Error bars“ представят

стойностите за 95% интервал на конфиденциалност. Интервалите на конфиденциалност (95%) бяха изчислени по метода на Clopper-Pearson. И в двата случая за минимална стойност, при която се приема статистическа значимост, беше избрана  $p < 0,05$ .

## 6. Резултати

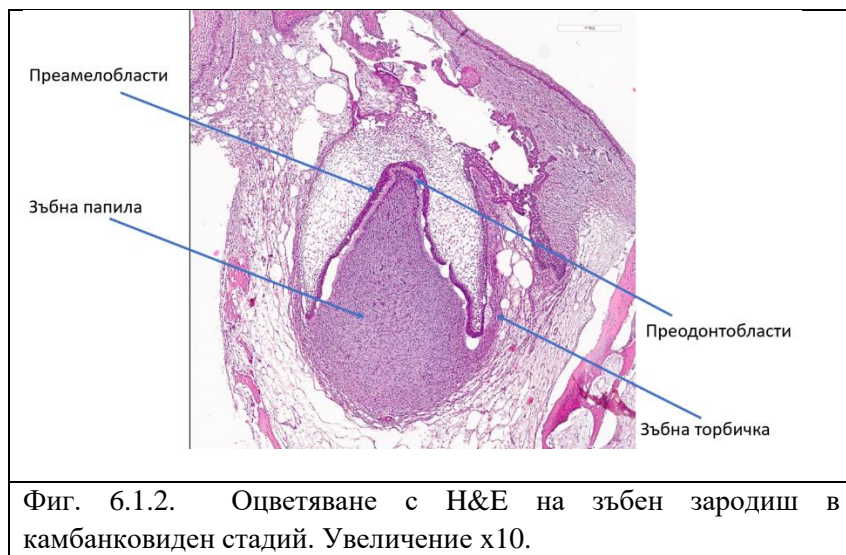
### 6.1. Оцветяване с хематоксилин и еозин



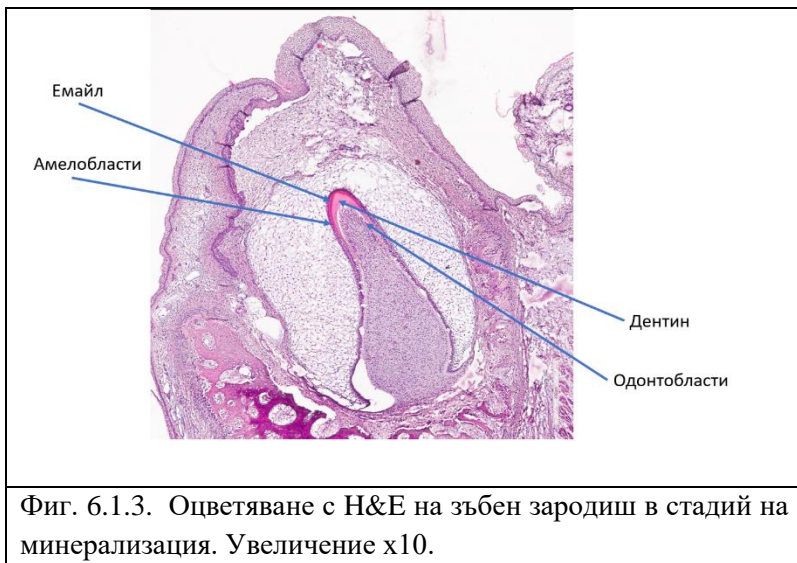
Фиг. 6.1.1 Оцветяване с Н&Е на зъбен зародиш в шапковиден стадий, със стрелки са означени по-важните структури. Мащабна линия 400  $\mu\text{m}$ .

На препаратът са видими основните структури, които изследваме, а именно: орален епител, епително повлекло, емайлов орган и съставлящите го вътрешен, външен емайлов

епител, интермедиерен епител и звездовиден ретикулум, зъбна папила и зъбна торбичка (Фиг. 6.1.1)



На този стадий имаме оформени преамелобласти и преодонтобласти, които чрез своята по-нататъшна диференциация ще се превърнат в напълно диференцирани минерал образувачи клетки - амелобласти и одонтобласти. Степента на тяхната диференциация е важна за изследването (Фиг. 6.1.2.).



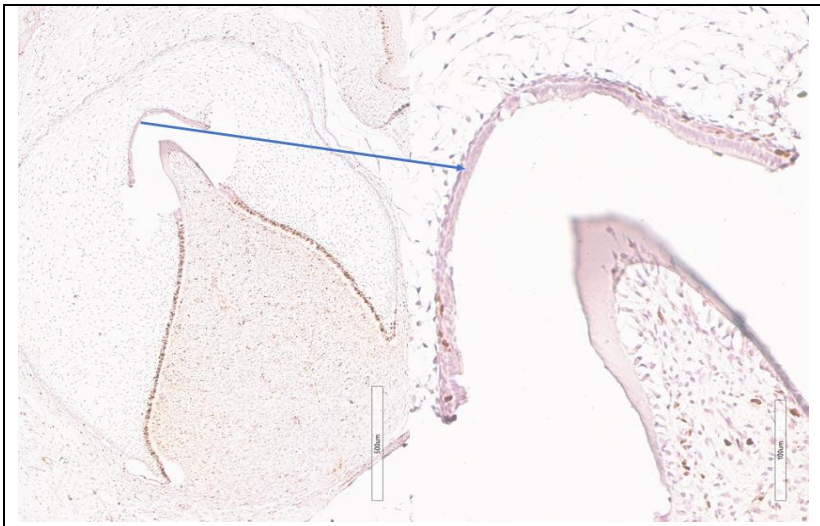
На Фиг. 6.1.3. са отбелязани вече депозираните минерални структури – дентин и емайл, както и съответните им образуващи ги клетки – одонтобласти и амелобласти. На фигурата се вижда преходът между диференцираните минерал-образуващи клетки към техните по-недифернцирани предшественици по склона на денталната папила, които още не са започнали депозит.



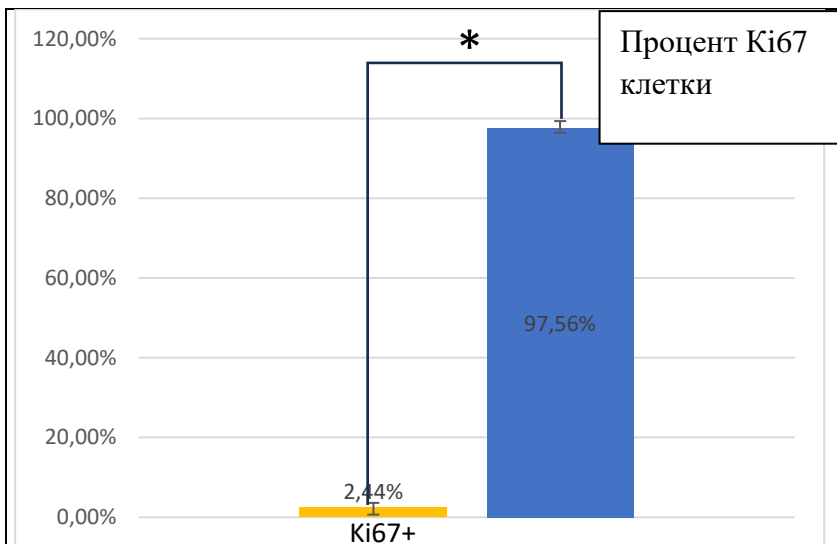
## 6.2. Имунохистохимично изследване с маркер за Ki67

Ki67 е специфичен маркер за активна клетъчна пролиферация. Ki-67 антигенът се открива предимно в клетъчното ядро през всички активни фази на клетъчния цикъл (G1, S, G2 и митоза), но отсъства при клетките в покой (G0).

Видимо е, че при върха на денталната папила, над отложения емайл, сред високо диференцираните амелобласти имаме много слаба положителна реакция (Фиг. 6.2.1.) тъй като имаме ниска пролиферативна активност. За това свидетелства и ниският процент клетки – 2,44% (Фиг. 6.2.2.)



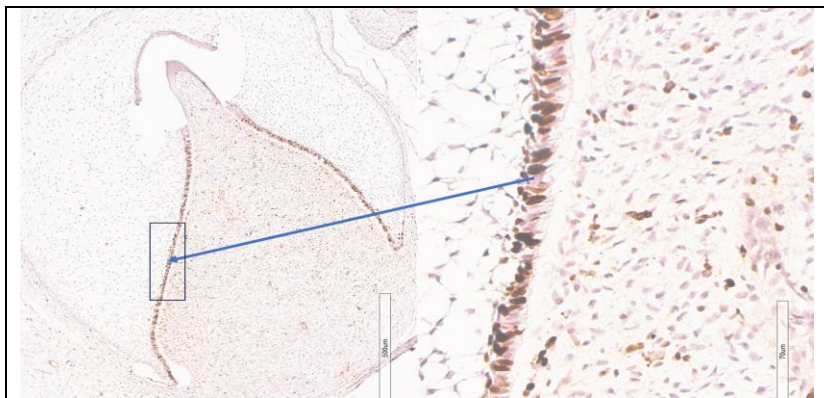
Фиг. 6.2.1. Зъбен зародиш на резец в стадий на минерализация, имунохистохимично изследване с маркер за Ki67. В ляво снимка на малко увеличение (мащабна линия 500  $\mu\text{m}$ ), в дясно снимка на голямо увеличение на диференцираните амелобласти (мащабна линия 100  $\mu\text{m}$ ).



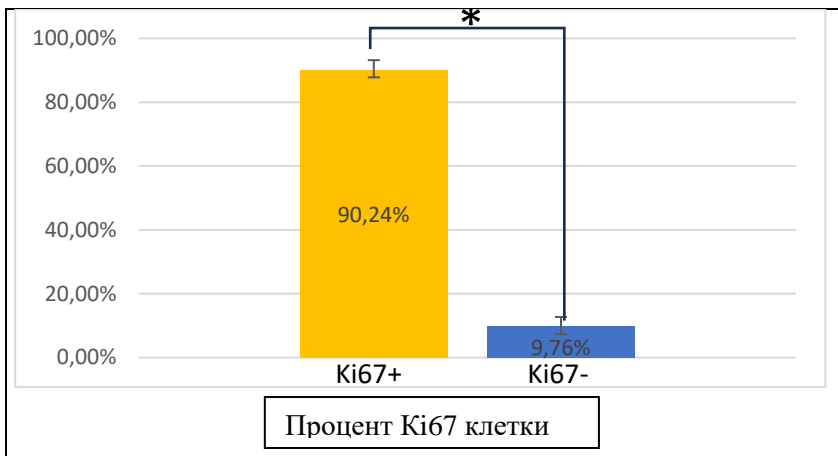
Фиг. 6.2.2. Процент Ki67 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра сред амелобластите.

\* $p < 0,05$

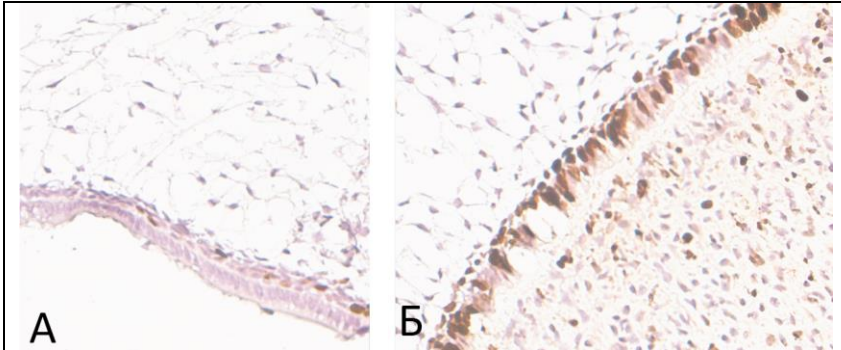
Тази активност се увеличава прогресивно по склона на денталната папила (Фиг.6.2.3.), където се намират по-слабо диференцираните преамелобласти и вътрешен емайлов епител, което се доказва и от високия процент на позитивните клетки (Фиг. 6.2.4.)



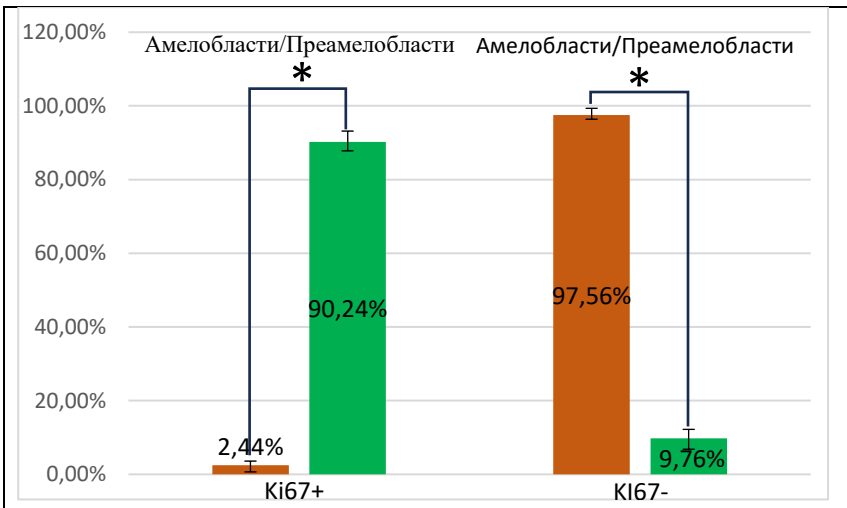
Фиг. 6.2.3. Зъбен зародиш на резец в стадий на минерализация, имунохистохимично изследване с маркер за Ki67. В ляво снимка на малко увеличение, в дясно снимка на голямо увеличение по склона на денталната папила.



Фиг. 6.2.4. Процент Ki67 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра сред преамелобластите. \* $p < 0,05$

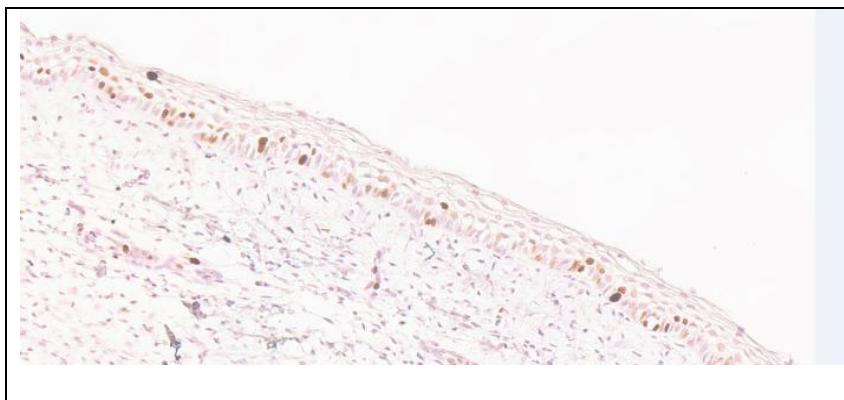


Фиг. 6.2.5. Сравняване на Ki67 положителни и отрицателни клетки сред амелобластите (А) и Преамелобластите (Б). Мащабна линия 60  $\mu$ m.



Фиг. 6.2.6. Процентно съотношение между Ki67 положителни и Ki67 отрицателни клетки сред амелобласти и преамелобласти

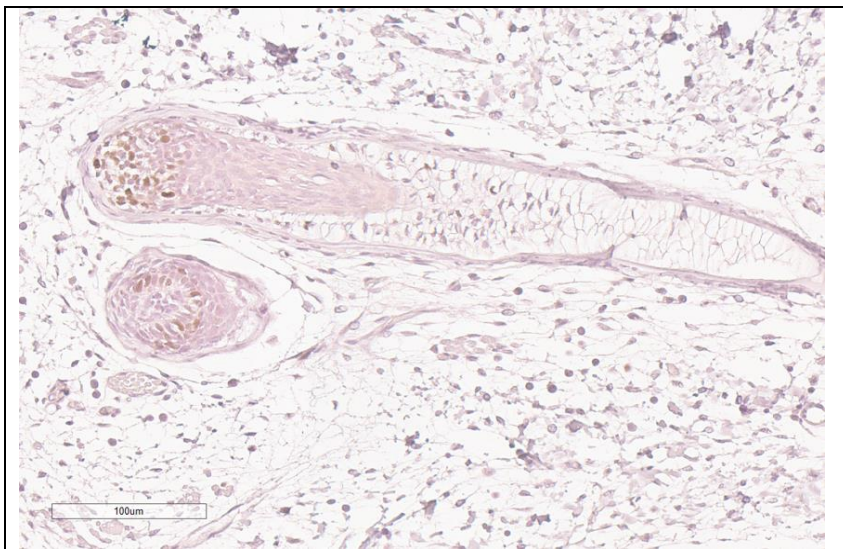
Ki67 положителните клетки почти отсъстват сред амелобластите - 2,44%, докато сред преамелобластите се наблюдава драстично различие, 90,24% са положителни.



Фиг. 6.2.7. Орален епител, имунохистохимично изследване с маркер за Ki67. Увеличение x20.

Горното твърдение може да се обоснове с изследване на оралния епител за същия маркер. Положителните клетки са най-вече тези разположени в герминативния слой, който е пролиферативно активен (Фиг. 6.2.7.).

Положителни клетки се откриват и в денталната папила, която на този етап има също висока пролиферативна активност.



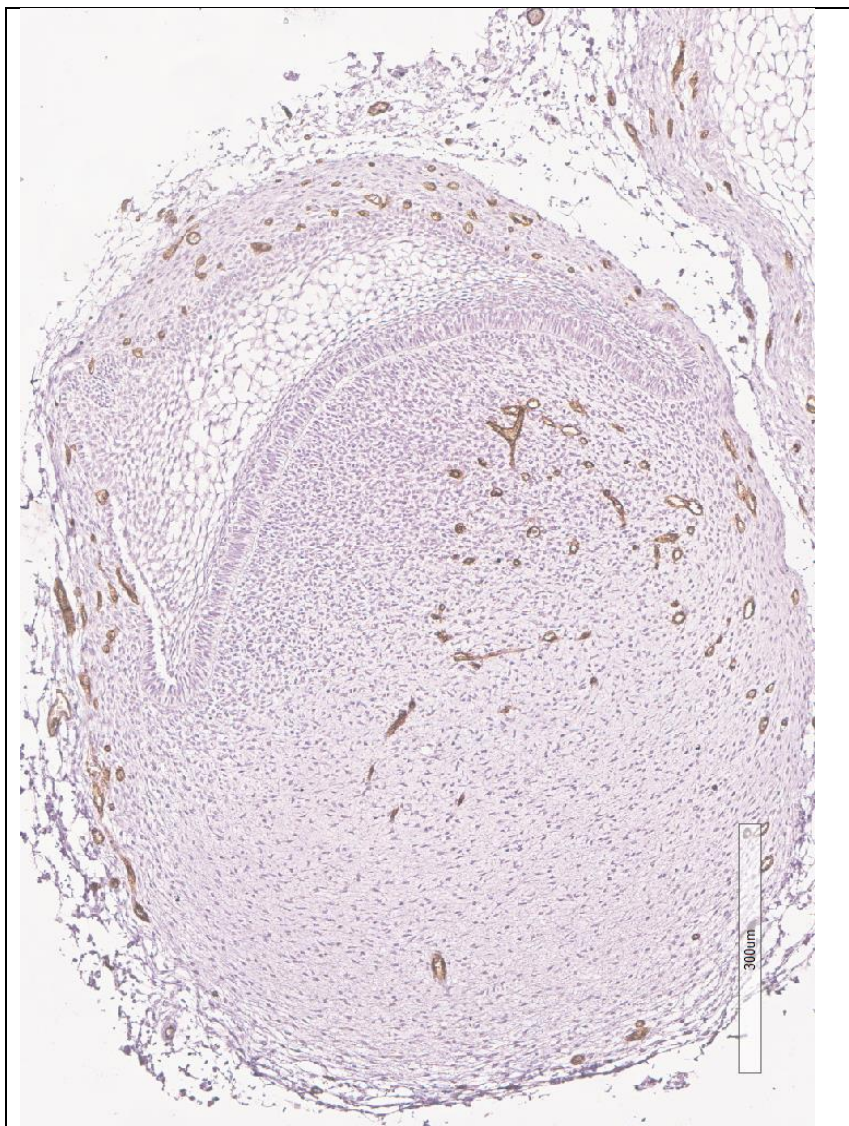
Фиг. 6.2.8. Космени фоликули от долна устна, имунохистохимично изследване с маркер за Ki67.

Наблюдават се космени фоликули с Ki67 позитивни клетки при космената луковица, което още веднъж показва твърдението изказано за пролиферативната активност на клетките при зъбния зародиш (Фиг. 6.2.8.).

### 6.3. Имунохистохимично изследване с маркер за CD34

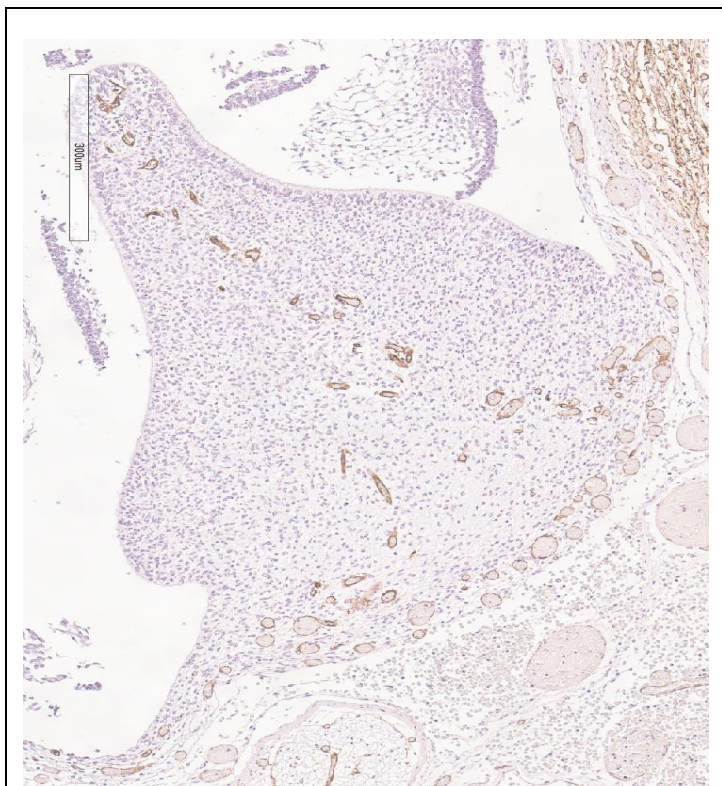
CD34 е трансмембранен гликофосфопротеин кодиран от CD34 гена. CD34 показва експресия при ранните хематопоеични и съдови прогениторни клетки, ендотелните клетки, пъпната връв и др.

Използвахме маркер за CD34 за да проследим съдовото разпределение в и около развиващия се зъбен зародиш.



Фиг. 6.3.1. Зъбен зародиш в стадий на зъбна шапка, имунохистохимично изследване с маркер за CD34.

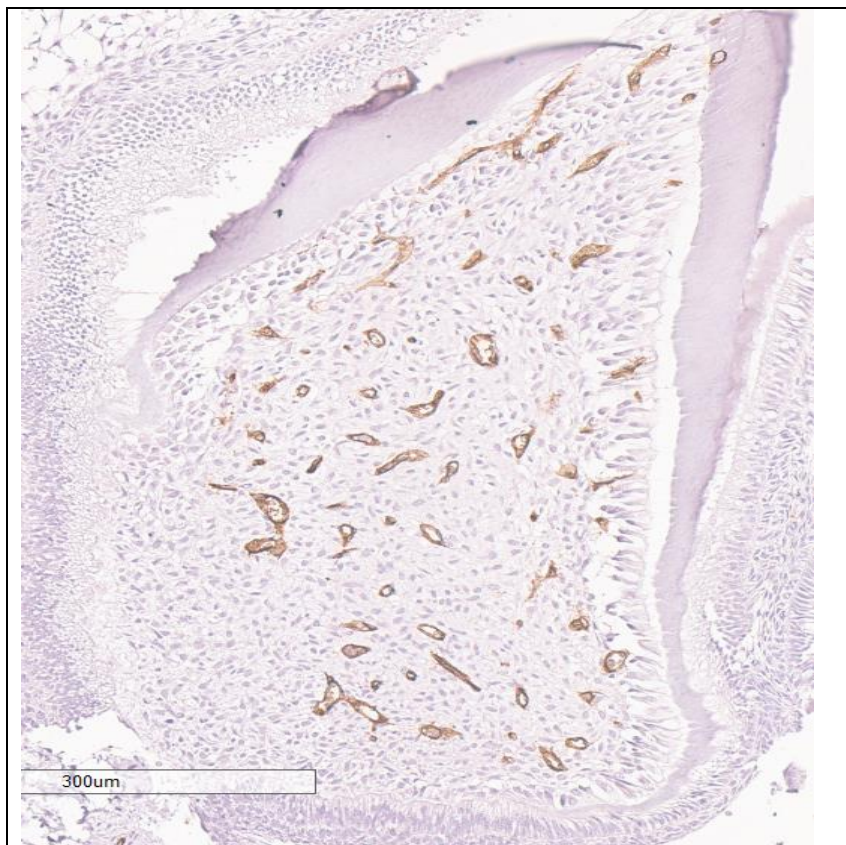
При този стадий (Фиг. 6.3.1.) съдовете са групирани основно при върха на зъбната папила и при зъбната торбичка и в двата случая в непосредствена близост до емайловия орган. Това е логично предвид факта, че той не е васкуларизиран и разчита за обмяната си на околните структури.



Фиг. 6.3.2. Зъбен зародиш в стадий на зъбна камбанка, имунохистохимично изследване с маркер за CD34. Емайловият орган не е интактен.



Васкуларизацията на зъбния зародиш при следващия стадий на развитието му (Фиг. 6.3.2.) нараства в посока към основата на денталната папила и намиращата се в близост част от зъбната торбичка във връзка с нуждите на прогениторните клетки в тази област.

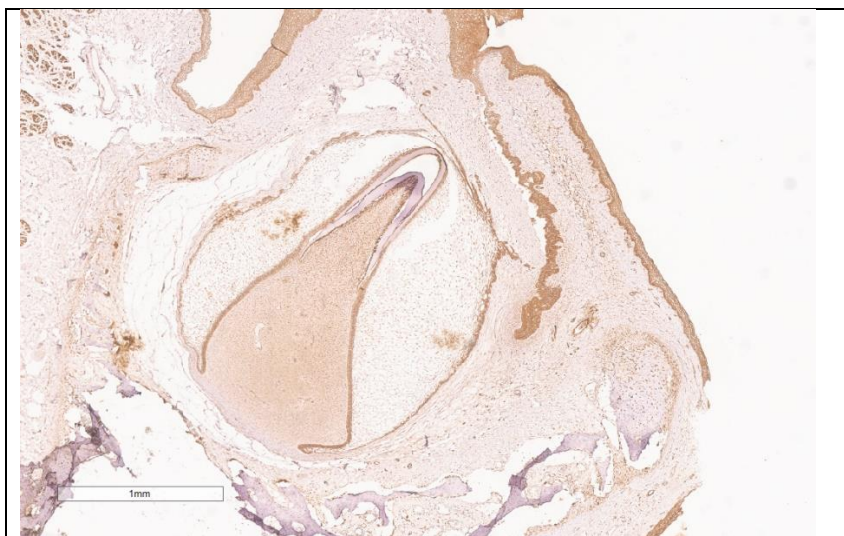


Фиг. 6.3.3. Зъбен зародиш в стадий на минерализация, имунохистохимично изследване с маркер за CD34.

При стадия на минерализация на зъбния зародиш (Фиг. 6.3.3.) личи повсеместна силна васкуларизация на денталната папила, което е свързано с усиления метаболизъм, диференциацията и високите синтетични изисквания към клетките.

#### 6.4. Имунохистохимично изследване с маркер за GFAP

GFAP е протеин, кодиран от GFAP гена. Той е тип 3 интермедиерен филаментен фактор, който се експресира активно в нервната система. Повсеместната положителна реакция при препарати от ембрионални долни челюсти доказва невроектодермалния произход на структурите в тази област. Все пак различните структури проявяват различна сила на експресия. (Фиг.1).

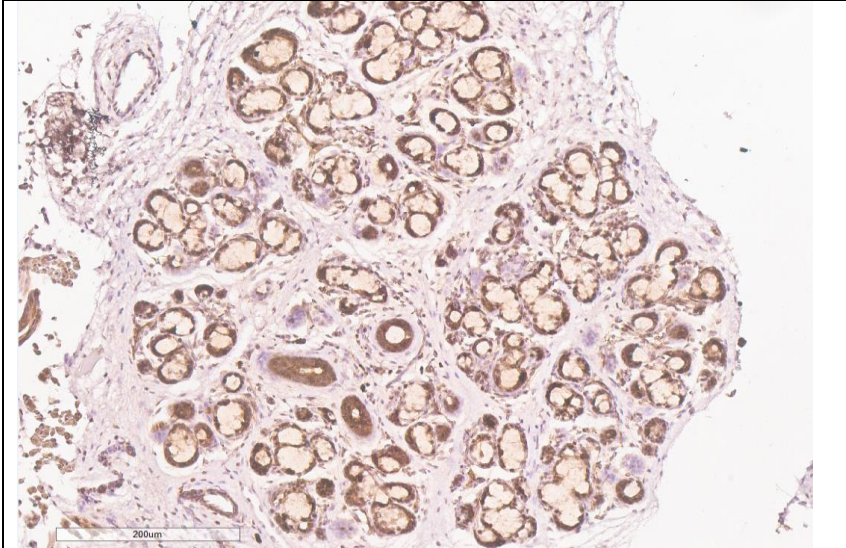


Фиг. 6.4.1. Зъбен зародиш в стадий на минерализация, имунохистохимично изследване с маркер за GFAP.

Най-висок положителен интензитет проявяват, оралният епител, жлезистият епител, епителното повлекло, емайловият орган и космените фоликули и одонтобластите (Фиг.2), които са структури с невроектодермален произход. Средна по сила реакция има при зъбната папила която има двоен произход – ектомезенхимен и мезенхимен. При останалите структури реакцията е слаба, но налична.

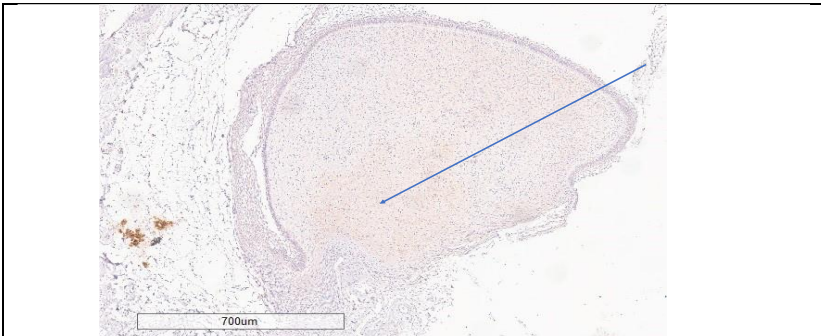


Фиг. 6.4.2. Космени фоликули от долна устна, имунохистохимично изследване с маркер за GFAP. Увеличение x20.

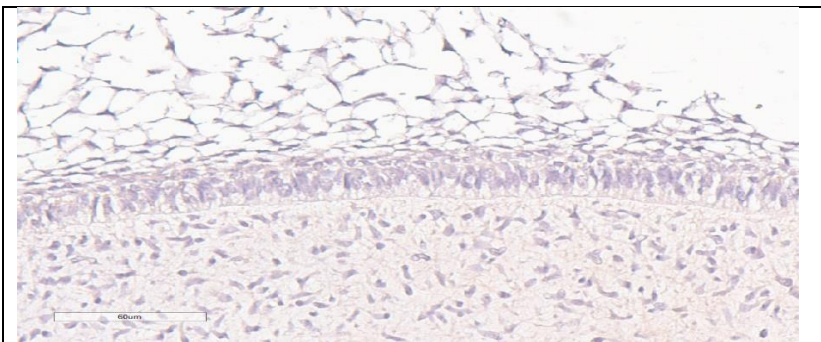


Фиг. 6.4.3. Слюнчени жлези, имунохистохимично изследване с маркер за GFAP.

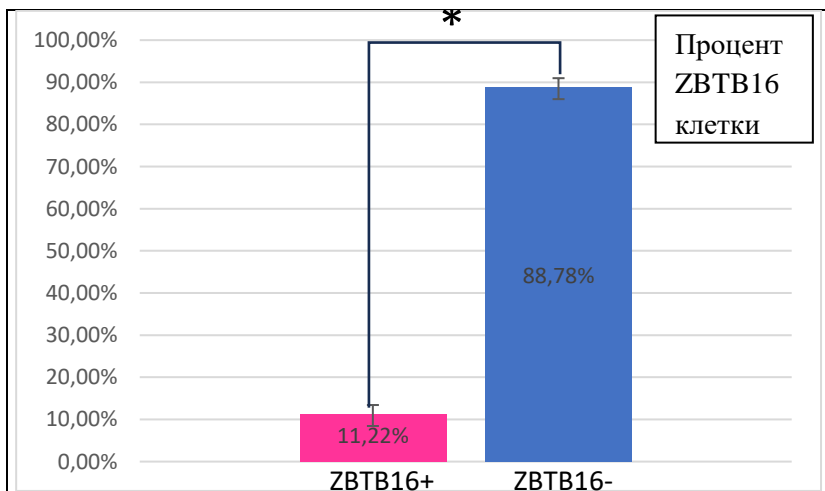
### 6.5. Имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16



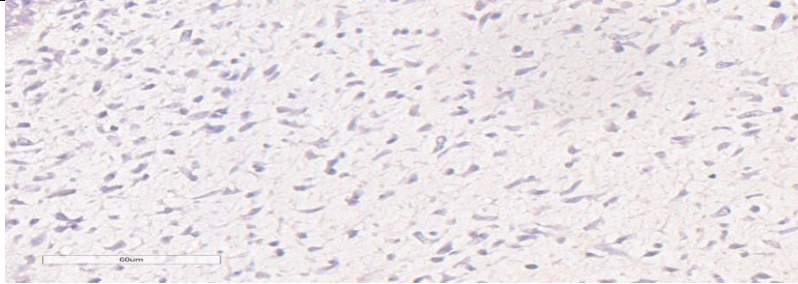
Фиг. 6.5.1. Стадий на зъбна шапка при кътен зъб, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16.



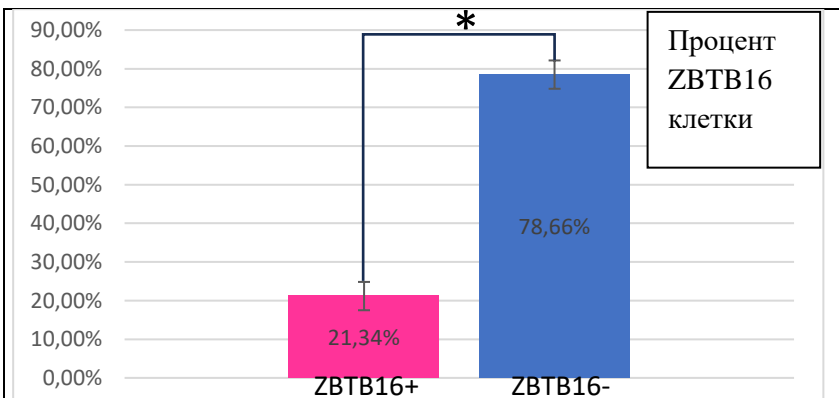
Фиг. 6.5.2. Стадий на зъбна шапка при кътен зъб – вътрешен емайлов епител, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16.



Фиг. 6.5.3. Процент ZBTB16 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра при вътрешния емайлов епител. \* $p < 0,05$

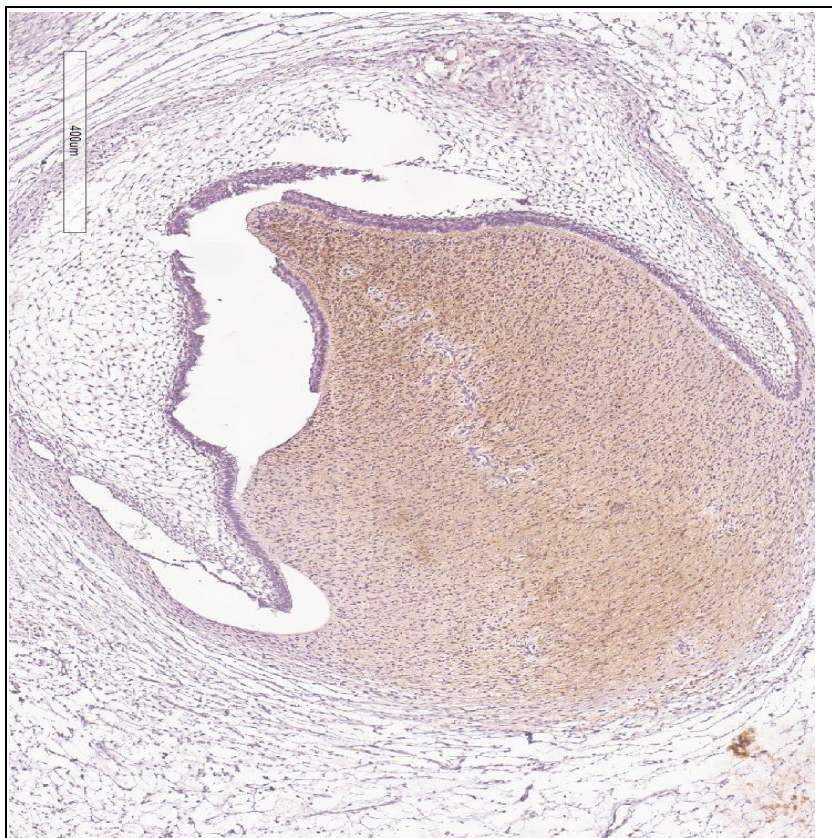


Фиг. 6.5.4. Стадий на зъбна шапка при кътен зъб – вътрешен емайлов епител, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16.

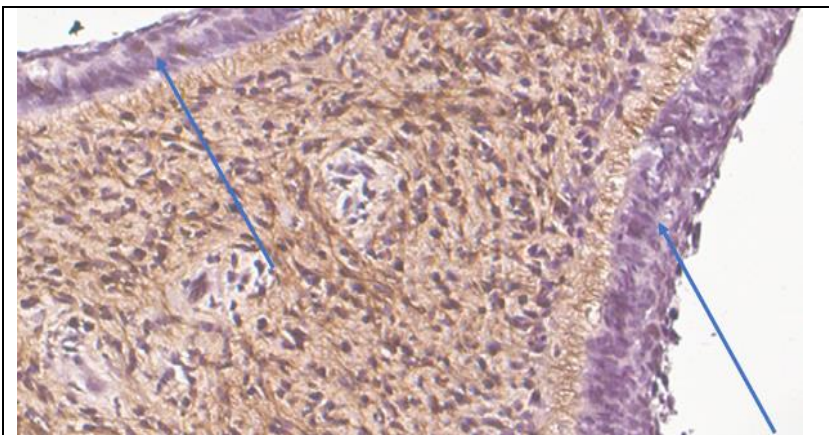


Фиг.6.5.5. Процент ZBTB16 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра при денталната папила.\* $p < 0,05$

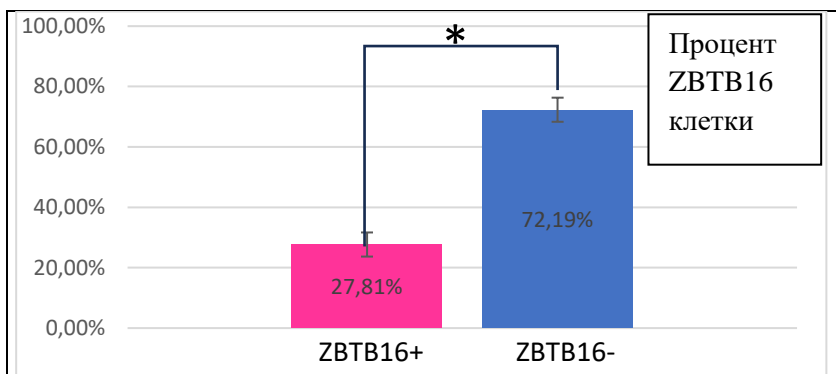
Има слаба положителна реакция в областта на денталната папила – 21,34% (Фиг. 6.5.4.) и вътрешния емайлов епител – 11,22% (Фиг. 6.5.2.) На този етап клетките все още са с ниска диференциация.



Фиг. 6.5.6. Зъбен зародиш в стадий на зъбна камбанка, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16.



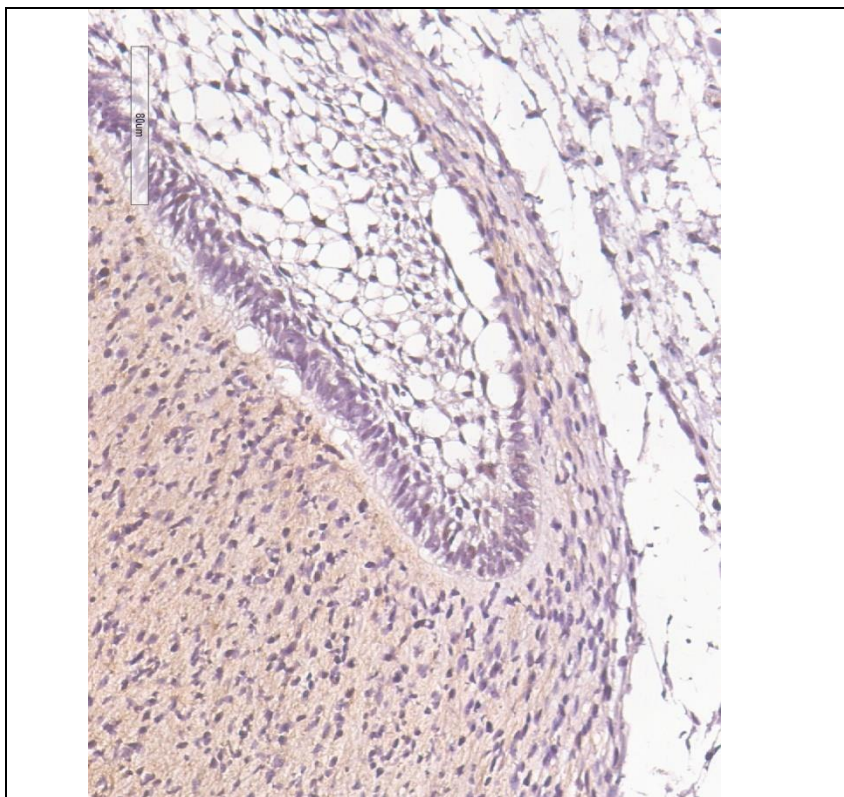
Фиг. 6.5.7. Зъбен зародиш в стадий на зъбна камбанка – преамелобласти при върха на денталната папила, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16. Увеличение x40.



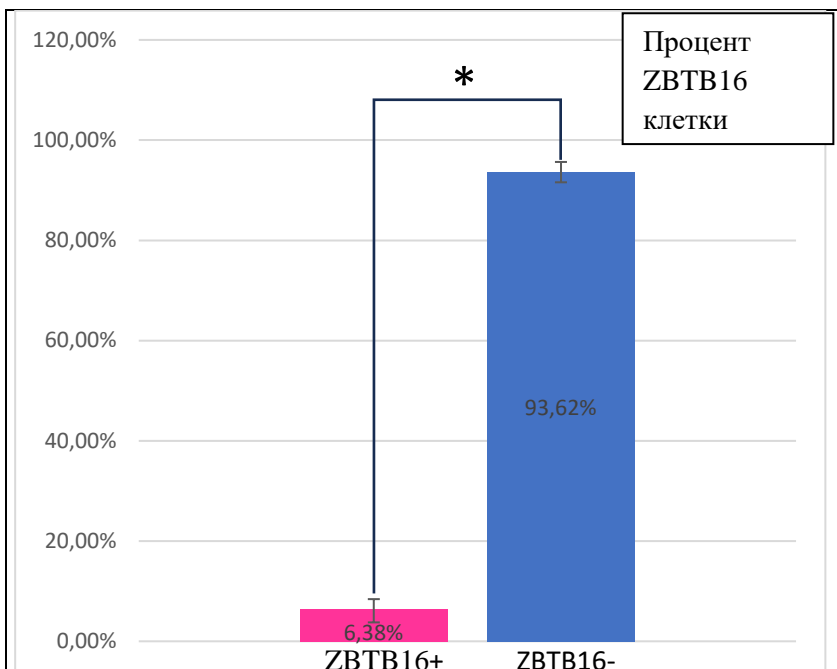
Фиг. 6.5.8. Процент ZBTB16 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра - преамелобласти при върха на денталната папила. \* $p < 0,05$



Сред клетките на вътрешния емайлов епител в областта на върха на денталната папила, процентът на ZBTB16 положителните клетки нараства на 27,81% (Фиг. 6.5.8.) спрямо предишния стадий във връзка с трансформацията на клетките към преамелобласти.



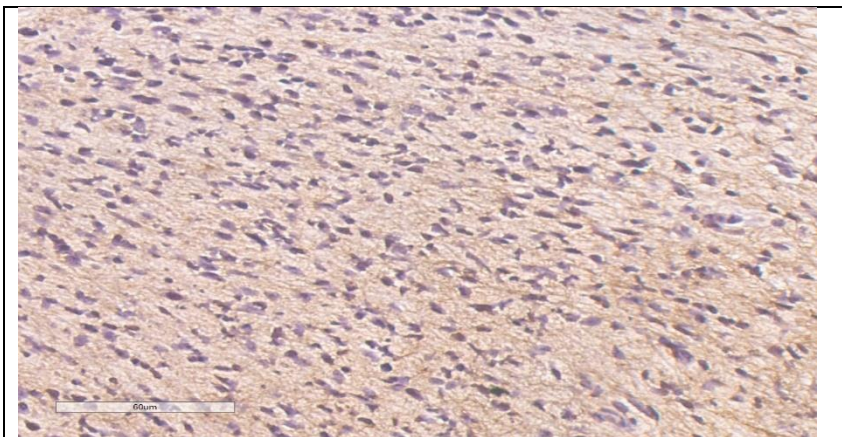
Фиг. 6.5.9. Зъбен зародиш в стадий на зъбна камбанка – преамелобласти в областта на цервикалната примка, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16.



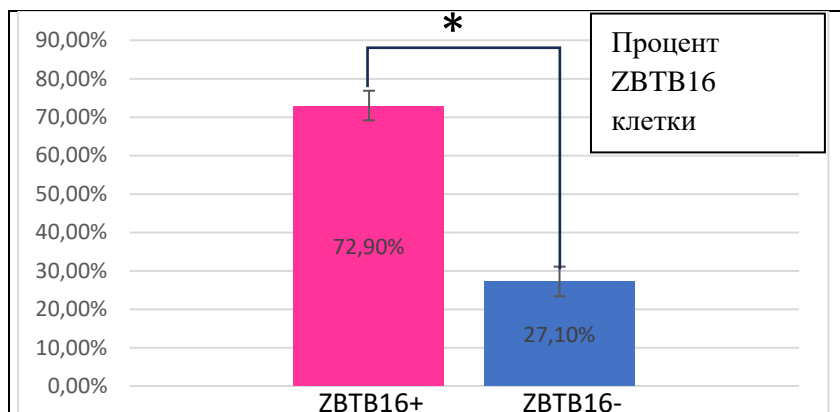
Фиг. 6.5.10. Процент ZBTB16 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра - преамелобласти в областта на цервикалната примка.

\* $p < 0,05$

Сред клетките на вътрешния емайлов епител в областта на цервикалната примка има нисък процент ZBTB16 позитивни клетки – 6,38% (фиг. 6.5.10) тъй като преамелобластната трансформация все още е ниска. Очаква се тези клетки да се трансформират последни.



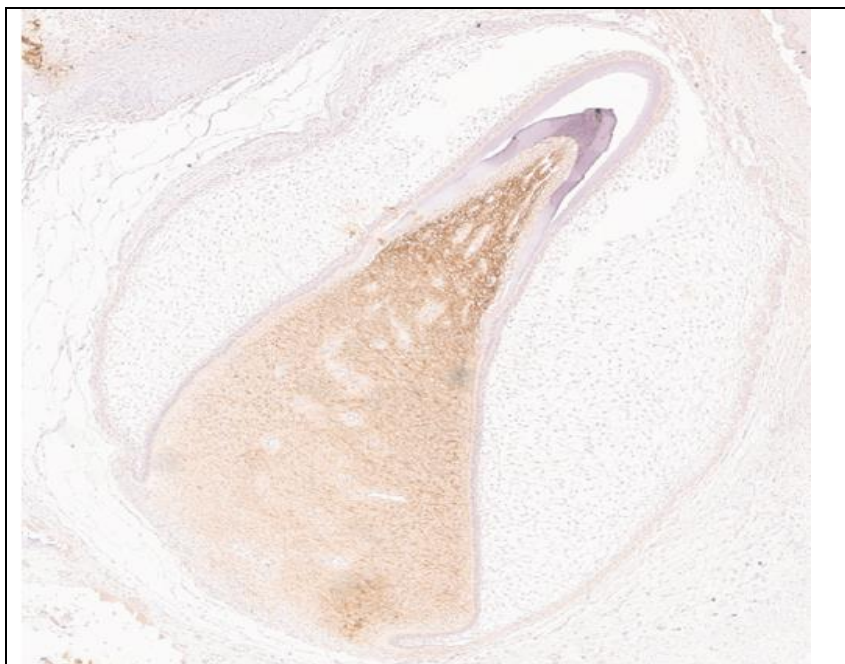
Фиг. 6.5.11. Зъбен зародиш в стадий на зъбна камбанка – дентална папила, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16.



Фиг. 6.5.12. Процент ZBTB16 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра - дентална папила.

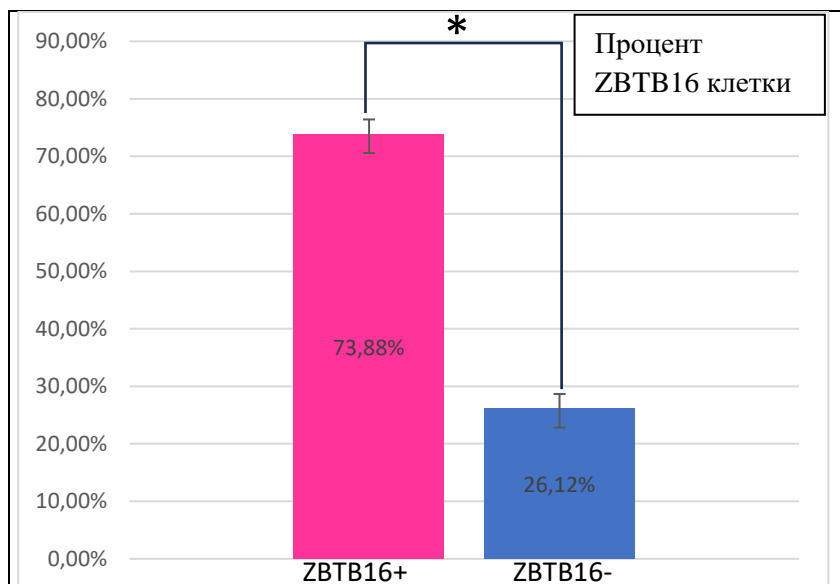
\* $p < 0,05$

Вижда се отчетливо силно позитивна реакция при денталната папила на този стадий във връзка с напредващата диференциация, която е повсеместна (Фиг. 6.5.11.). Повишеният брой позитивни клетки – 72,90% (Фиг. 6.5.12.) се дължи и на двойния произход на папилата ектомезенхимен и мезенхимен. Впечатление прави силната цитоплазмена реакция.



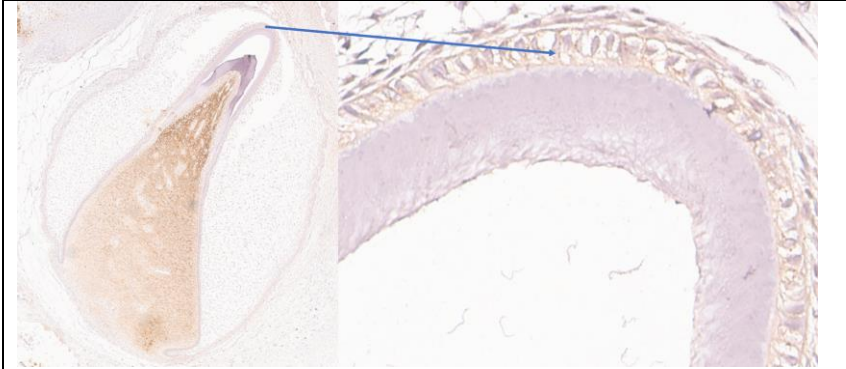
Фиг. 6.5.13. Стадий на минерализация на зъб от инцизалния регион на долната челюст, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16. Увеличение x20.

На малко увеличение ясно личи силно положителната реакция за ZBTB16 при върха на денталната папила, намаляваща отчетливо към основата и (Фиг. 6.5.13.). Реакцията и процента на положителните клетки е сходен с този от предишния стадий – 73,88% (Фиг.6.5.14.). Положителна е и зъбната торбичка (Фиг. 6.5.13.). Отново е налична силна цитоплазмена реакция.



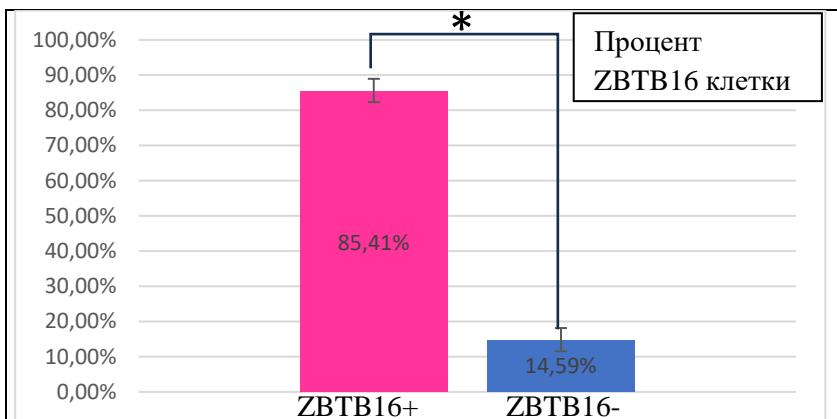
Фиг.6.5.14. Процент ZBTB16 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра - дентална папила.

\* $p < 0,05$



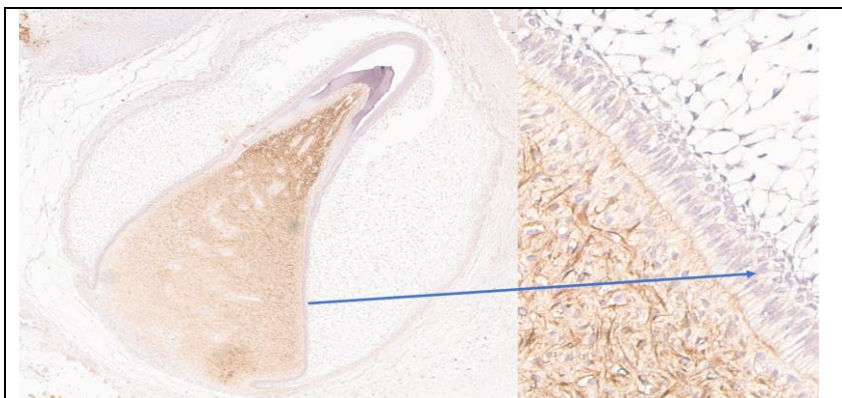
Фиг. 6.5.15. Стадий на минерализация на зъб от инцизалния регион на долната челюст, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16 (увеличение x40). ZBTB16 положителни амелобласти.

На този етап от зъбното развитие – зъбна камбанка, наблюдаваме напълно диференцирани амелобласти, които са отложили емайл при върха на денталната папила. Пропорционално на степента на специализация нараства и процента на положителните клетки – 85,14% (Фиг. 6.5.16.), както и силата на положителната реакция.

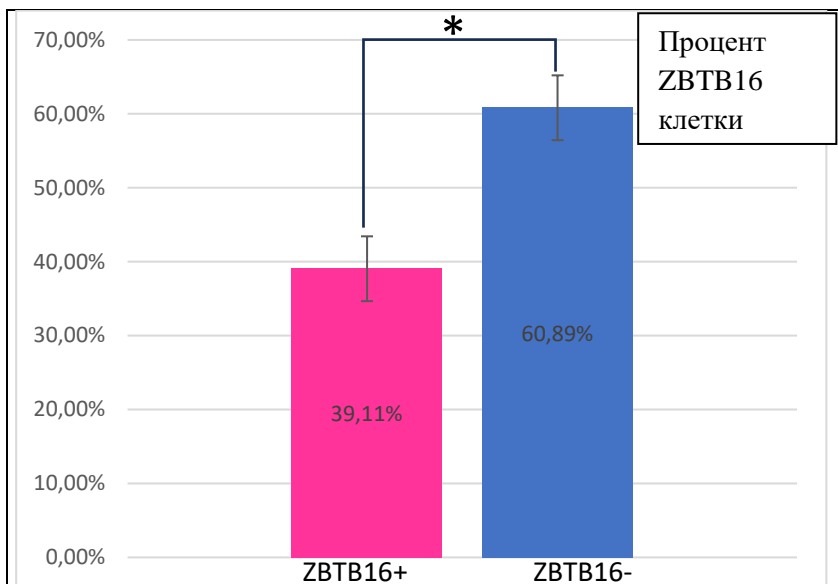


Фиг. 6.5.16. Процент ZBTB16 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра - амелобласти.

\* $p < 0,05$



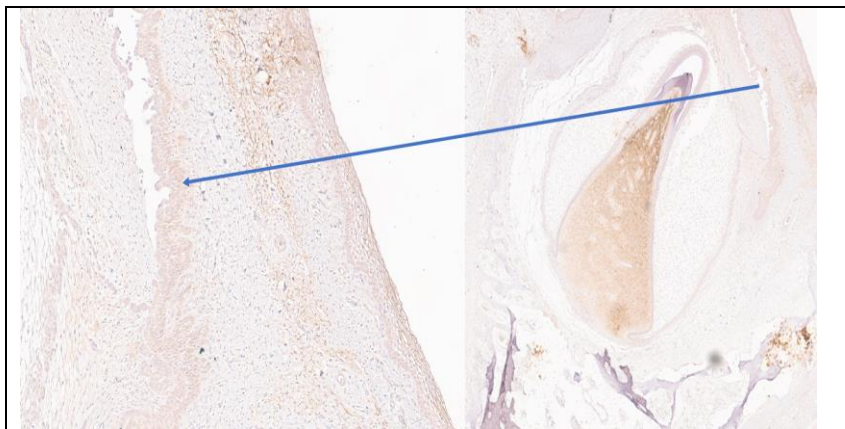
Фиг. 6.5.17. Стадий на минерализация на зъб от инцизалния регион на долната челюст, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16 (увеличение x40). ZBTB16 положителни преамелобласти.



Фиг. 6.5.18. Процент ZBTB16 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра - преамелобласти. \* $p < 0,05$

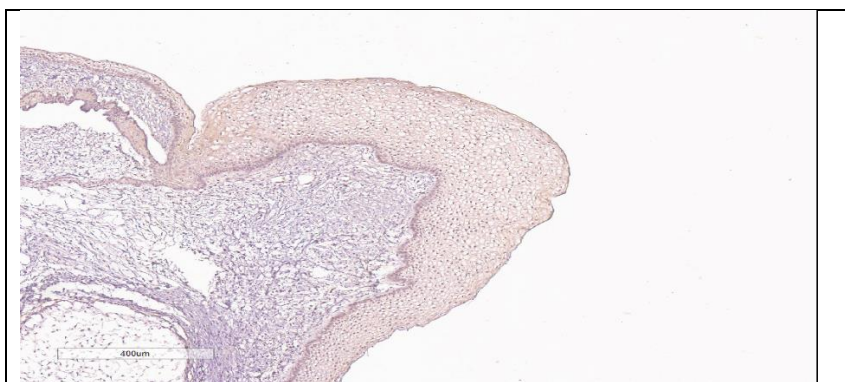
При сравнение на процента позитивни клетки и интензитета на положителната реакция между амелобластите и преамелобластите се забелязва преимущество при диференцираните амелобласти произвели емайл, отколкото при техните по-недиференцирани предшественици преамелобластите – 39,11% (Фиг. 6.5.18.) по склона на денталната папила.





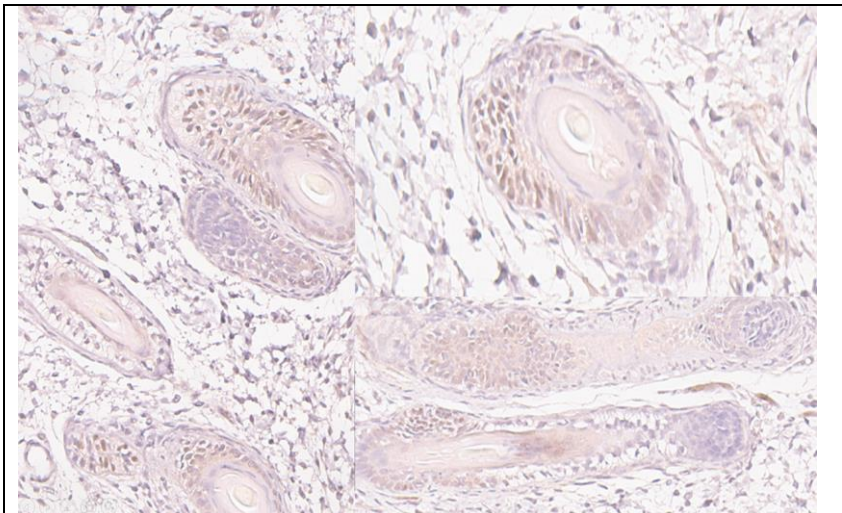
Фиг. 6.5.19. Епително повлекло (*gubernaculum dentis*), имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16. Увеличение x20.

Епителното повлекло (*gubernaculum dentis*) при всички разгледани случаи е положително за ZBTB16 (Фиг. 6.5.19.)



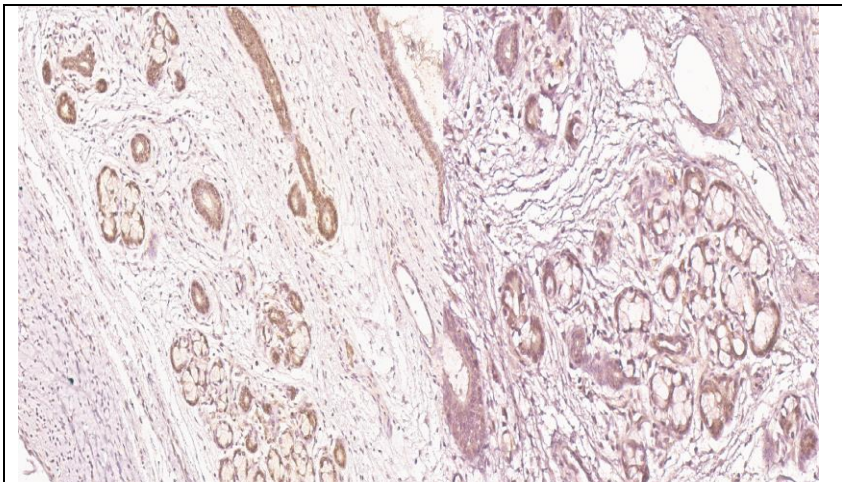
Фиг. 6.5.20. Орален епител, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16

Оралният епител показва положителна реакция, но тя нараства в посока от герминативния към повърхностния епителен слой (Фиг. 6.5.20.) или от по недиференцираните към по-диференцираните клетки.



Фиг. 6.5.21. Космени фоликули от долна устна, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16. Увеличение x40.

При изследване на препарат от долна устна с маркер за ZBTB16 (Фиг. 6.5.21.), се откриха положитни клетки от външната и вътрешната епителна обвивка на космените фоликули. При космените луковици, клетките не са положителни.



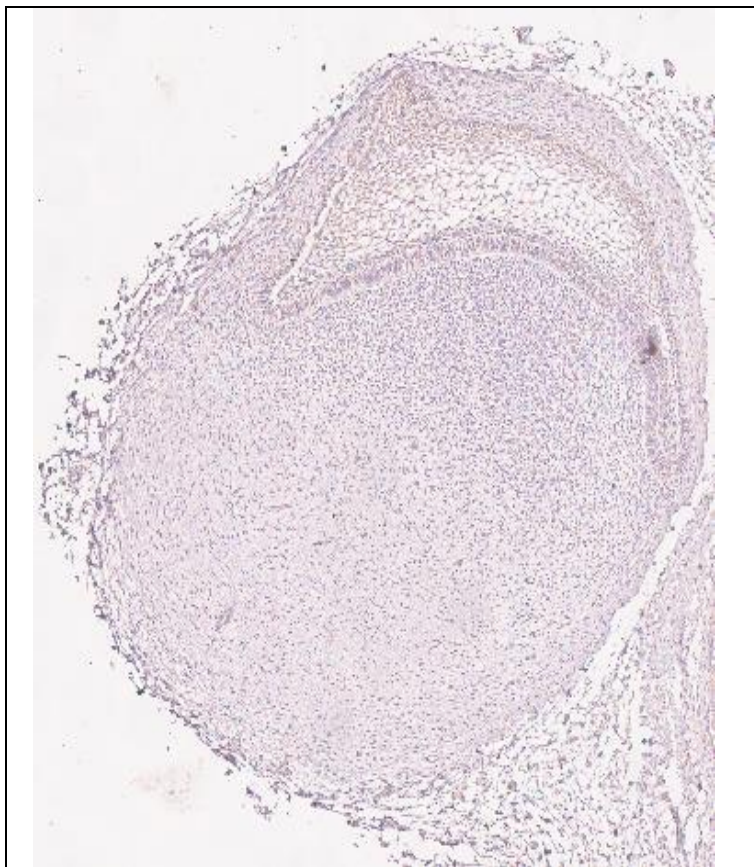
Фиг. 6.5.22. Слезни жлези и изходни канали, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB16. Увеличение x20.

Клетките на слезните жлезни ацини, както и на изходните им канали показват положителна реакция за ZBTB16 (Фиг. 6.5.22.).

## 6.6. Имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20

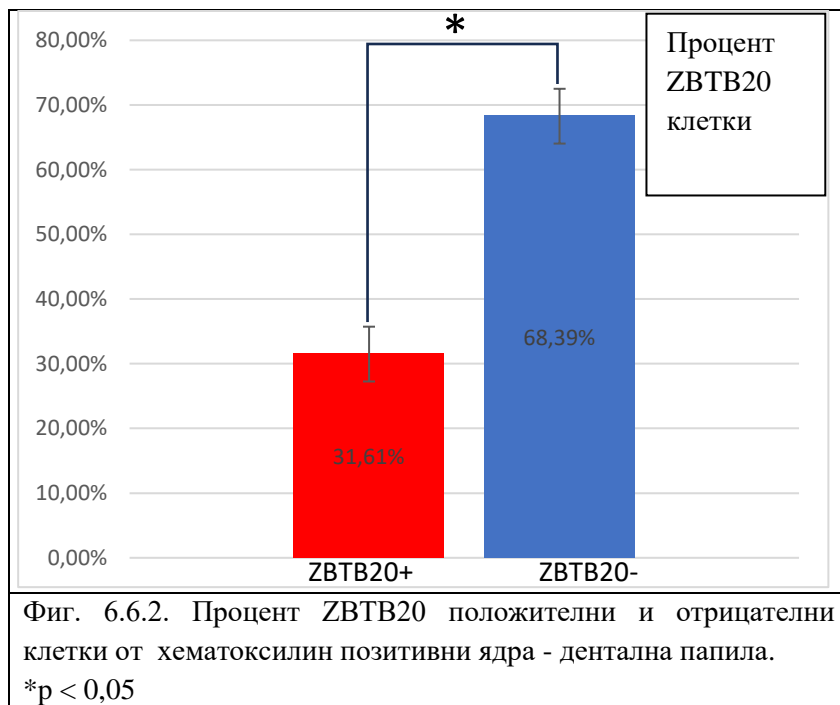
ZBTB20 принадлежи към BTV/POZ (broad complex tramtrack bric-a-brac/poxvirus and zinc finger) домейн съдържащите транскрипционни фактори. Протеините са локализирани в ядрото и са свързани с прогресията на клетъчния цикъл. Мутации в гена за ZBTB20 се асоциират с Примроуз синдром. ZBTB20 се експресира в неврални прогениторни клетки, астроцити, клетки на имунната система, регулира хепатоцитната пролиферация и др. Има данни, за

участието му в регулацията на пролиферацията на прогениторните клетки в зъбната пулпа.

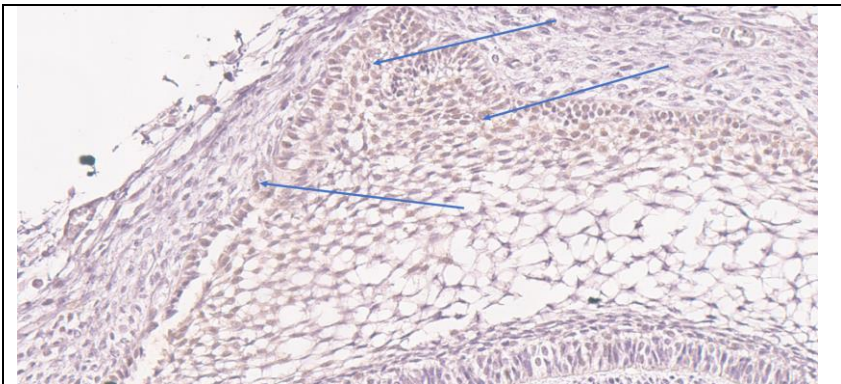


Фиг. 6.6.1. Стадий на зъбна шапка при кътен зъб, имунохистохимично изследване с маркер за ZBT20. Увеличение x20

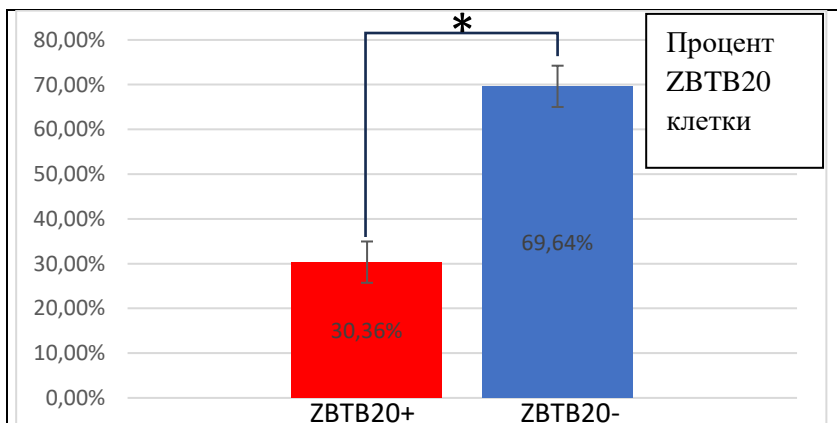
На стадий зъбна шапка клетките на зъбния зародиш са слабо диференцирани и с висока митотична активност (Фиг. 6.6.1)



Наблюдава се умерена положителна реакция за ZBTB20 при денталната папила, която е с хомогенно разпределение – 33,61% (Фиг. 6.6.2)



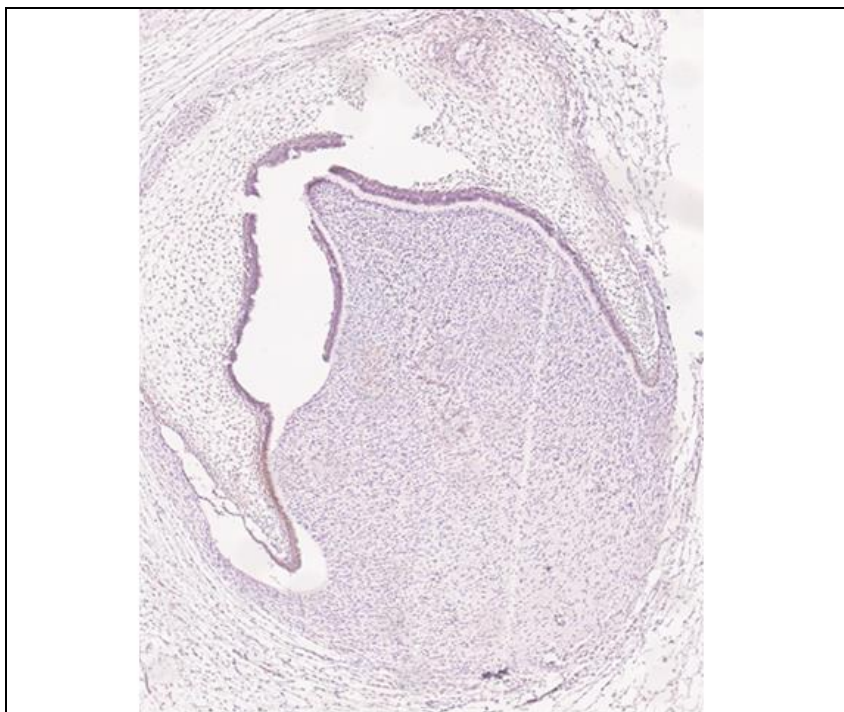
Фиг. 6.6.3 Стадий на зъбна шапка при кътен зъб, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20 – емайлов орган. Увеличение x40.



Фиг. 6.6.4 Процент ZBTB20 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра – емайлов орган.

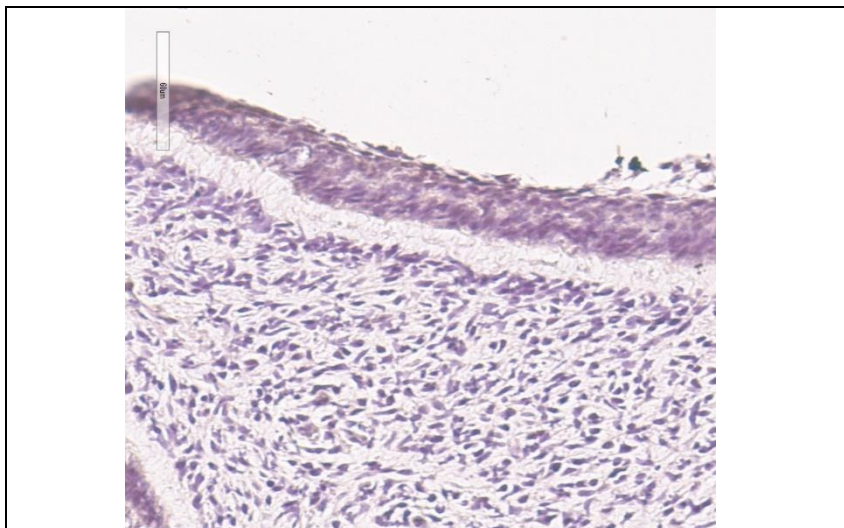
\* $p < 0,05$

На този етап (Фиг. 6.6.3.) се наблюдава положителна реакция за ZBTB20 при слабо диференцираните клетки на емайловия орган – 30,36% (Фиг. 6.6.4.)



Фиг. 6.6.5. Зъбен зародиш в стадий на зъбна камбанка, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20. Увеличение x20.

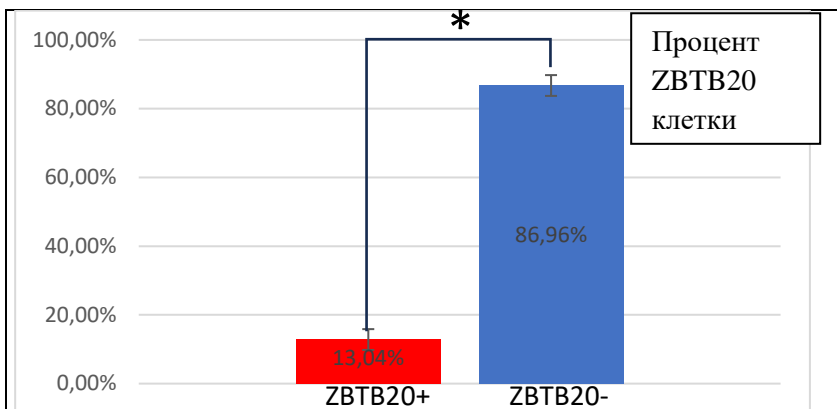
На стадий зъбна камбанка имаме слаба положителна повсеместна реакция, с изключение на клетките на вътрешния емайлов епител в областта на цервикалната примка, където тя е значителна (Фиг.6.6.5.).



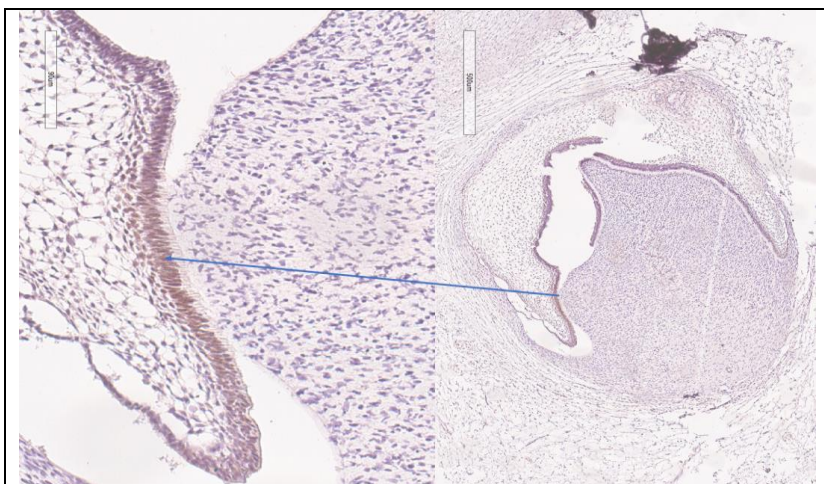
Фиг. 6.6.6. Зъбен зародиш в стадий на зъбна камбанка - преамелобласти, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20.

Вътрешният емайлов епител при върха на зъбната папила е показва слабо позитивна реакция във връзка с диференциацията му към преамелобласти(Фиг.6.6.6.). Процентът на положителните клетки е 13,04% (Фиг. 6.6.7.)

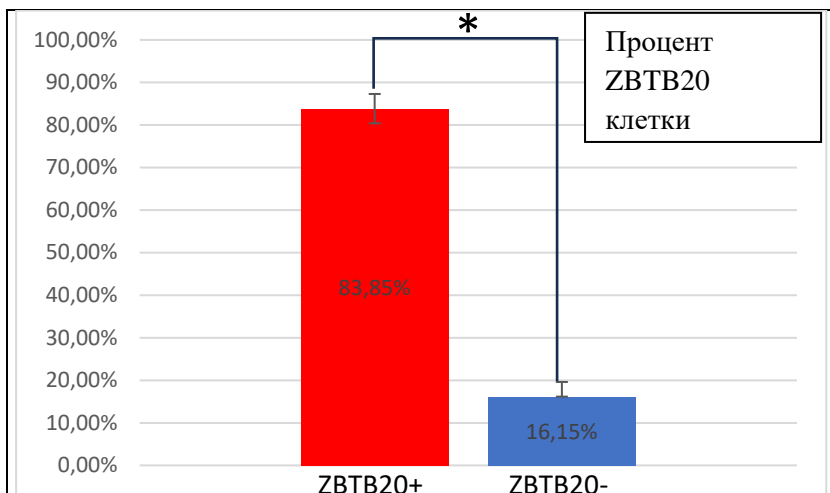




Фиг. 6.6.7. Процент ZBTB20 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра – преамелобласти.  
\* $p < 0,05$

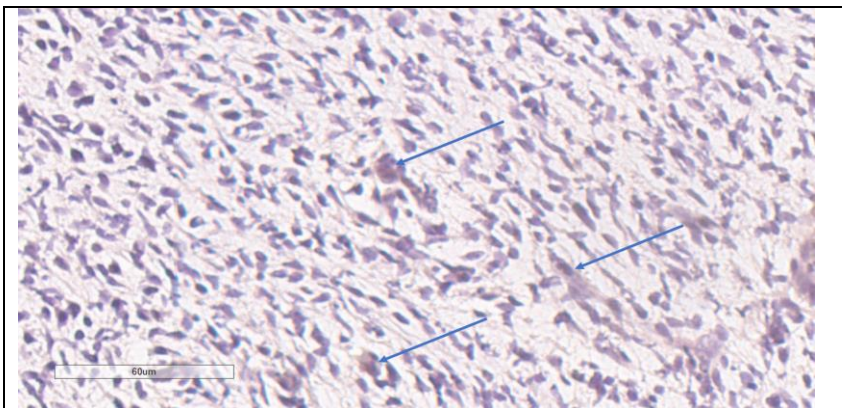


Фиг. 6.6.8. Стадий на зъбна камбанка при кътен зъб, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20.

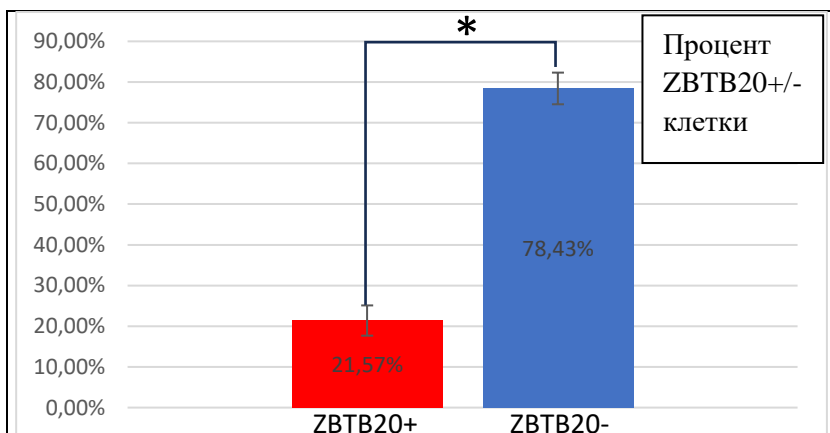


Фиг. 6.6.9. Процент ZBTB20 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра – преамелобласти в областта на цервикалната примка. \* $p < 0,05$

Забелязват се ZBTB20 положителни клетки при вътрешния емайлов епител в областта на цервикалната примка (Фиг.6.6.9.), където има най слабо диференцирани клетки. При това техният процент е значителен – 83,85% (Фиг.6.6.9.)

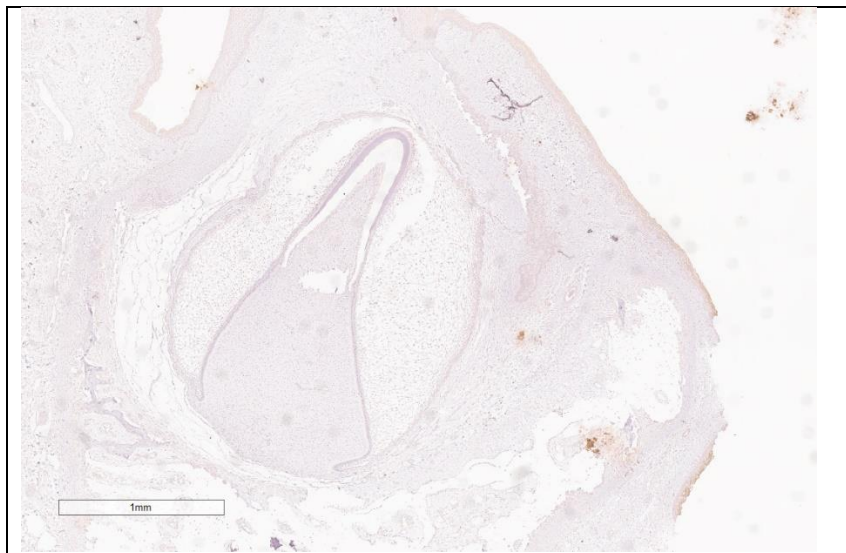


Фиг. 6.6.10. Стадий на зъбна камбанка при кътен зъб, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20 – дентална папила (голямо увеличение - стрелки).



Фиг. 6.6.11. Процент ZBTB20 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра – дентална папила.  
\* $p < 0,05$

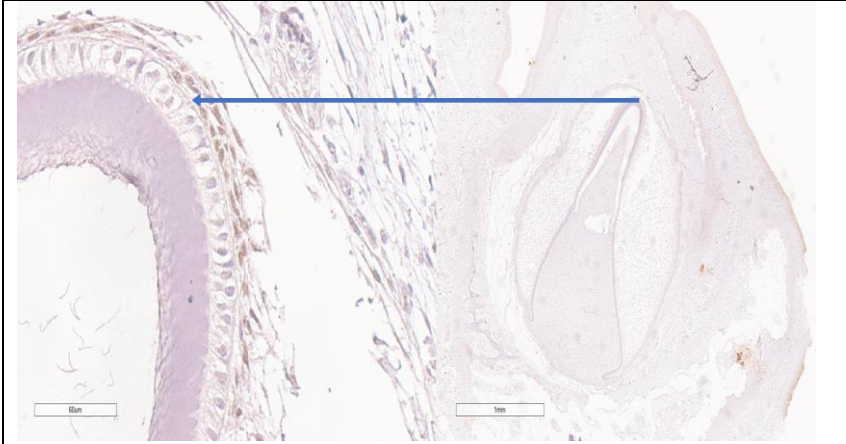
При денталната папила също се наблюдават ZBTB20 положителни клетки (Фиг. 6.6.10), като техния процентно съотношение не се е повишило спрямо това от предишния стадий, дори е по ниско – 21,57% (Фиг.6.6.11.).



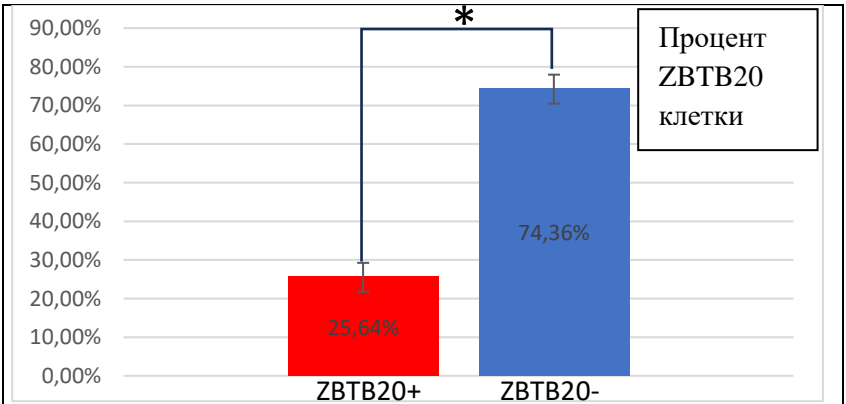
Фиг. 6.6.12. Стадий на минерализация при кътен зъб, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20 – (малко увеличение).

При стадия на минерализация (Фиг. 6.6.12.), на малко увеличение се вижда целият зъбен зародиш. Започнало е отлагането на минерални структури към върховата част на денталната папила - емайл и дентин от съответните диференцирани клетки - амелобласти и одонтобласти.

В близост личи силната положителна реакция на оралният епител и епителното повлекло.



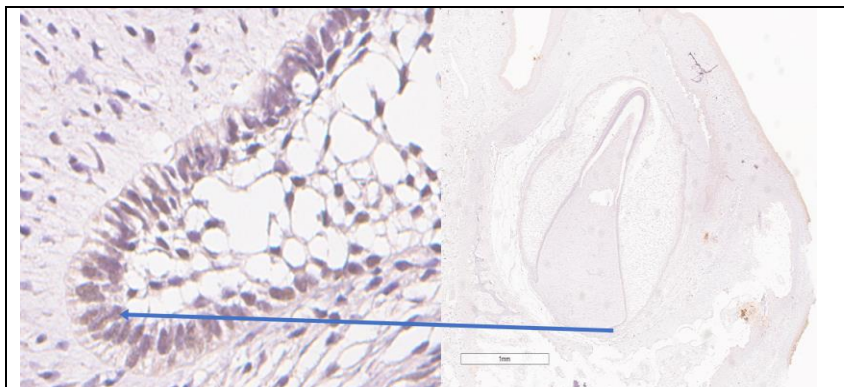
Фиг. 6.6.13 Стадий на минерализация при кътен зъб, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20 - амелобласти



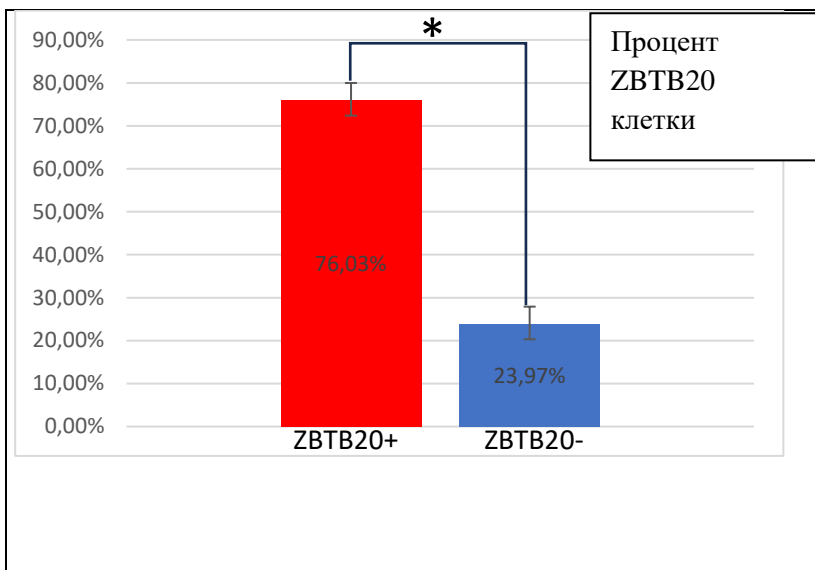
Фиг. 6.6.14. Процент ZBTB20 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра – амелобласти.

\* $p < 0,05$

Забелязват се много на брой положителни клетки при интермедиерния слой на денталния орган, но пък подлежащите амелобласти показват слаба реакция (Фиг.6.6.13.). Процентното отношение възлиза само на 26,64% (Фиг. 6.6.14.)

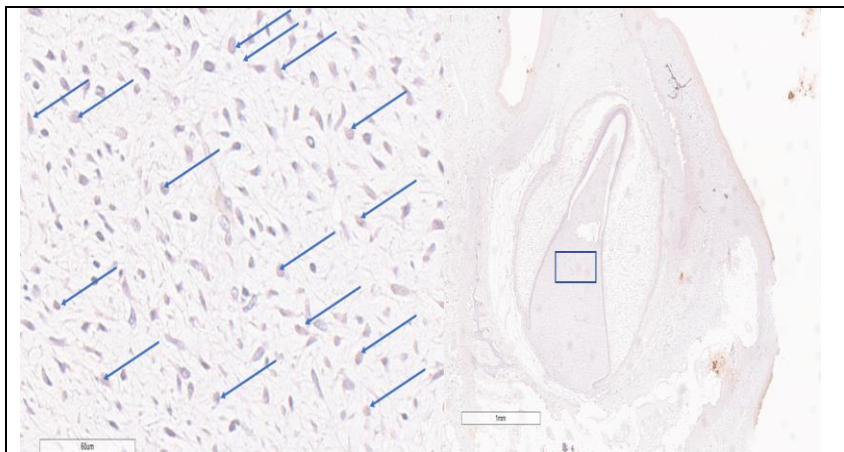


Фиг. 6.6.15. Стадий на минерализация при кътен зъб, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20 – цервикална примка. Увеличение x40.

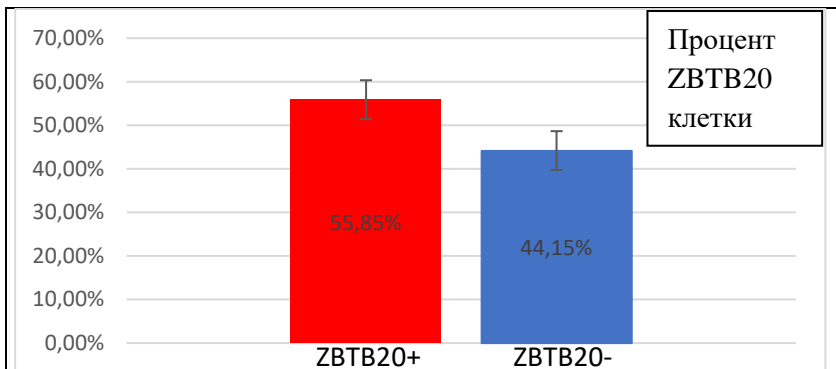


Фиг. 6.6.16. Процент ZBTB20 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра – цервикална примка. \* $p < 0,05$

Продължавайки надолу по денталната папила, преамелобластите придобиват все по силна реакция, докато стигнем до цервикалната примка където епителът е силно положителен, а клетките по-слабо диференцирани (Фиг.6.6.15). Тук процентното отношение на положителните клетки е значително повишено – 76,03% (Фиг. 6.6.16)



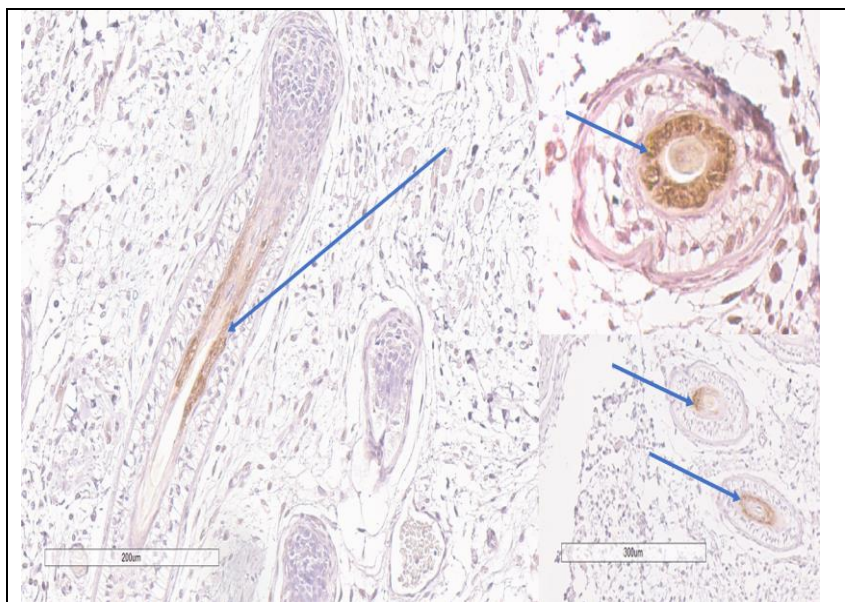
Фиг. 6.6.17. Стадий на минерализация при кътен зъб, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20 – зъбна папила (голямо увеличение)



Фиг. 6.6.18. Процент ZBTB20 положителни и отрицателни клетки от хематоксилин позитивни ядра – дентална папила. \* $p > 0,05$

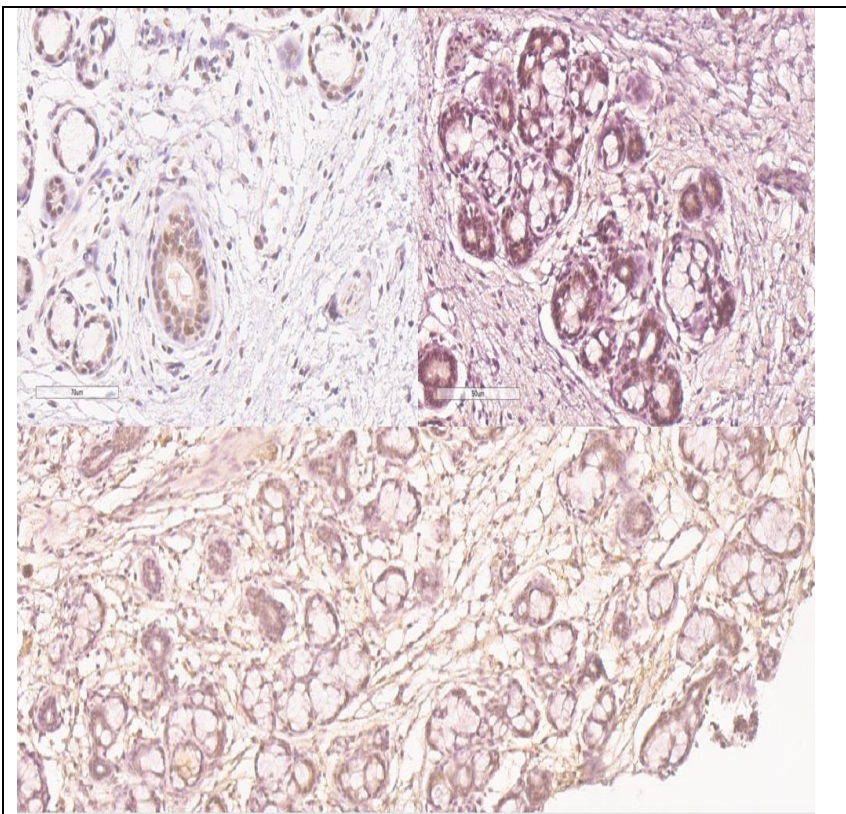


В зъбната папила се наблюдават ZBTB20 положителни клетки (Фиг. 6.6.17), които са повече на брой от тези в предишните стадии – 55,85% (Фиг. 6.6.18) и отново са хомогенно и повсеместно разпространени.



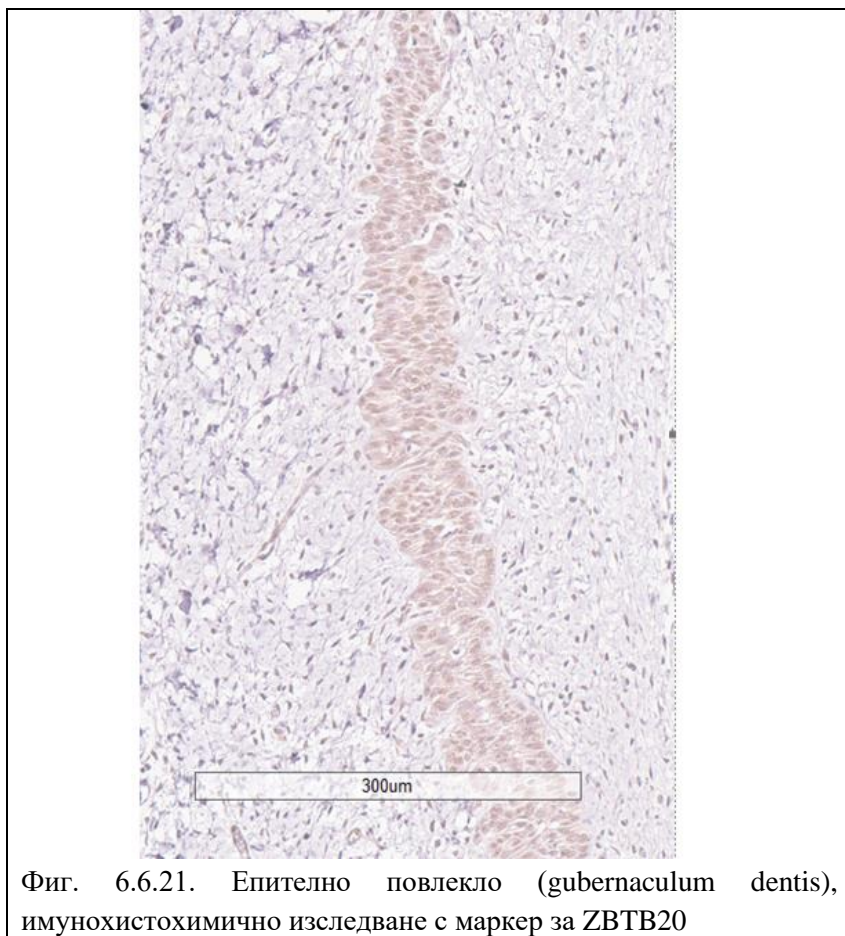
Фиг. 6.6.19. Препарат от долна устна, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20.

Впечатление прави силно положителната реакция при космените фоликули и по-конкретно при клетките на вътрешната епителна коренова обвивка. Клетките при космената луковица не са положителни (Фиг. 6.6.19).



Фиг. 6.6.20. Слезни жлези и изходни канали, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20. Увеличение x20.

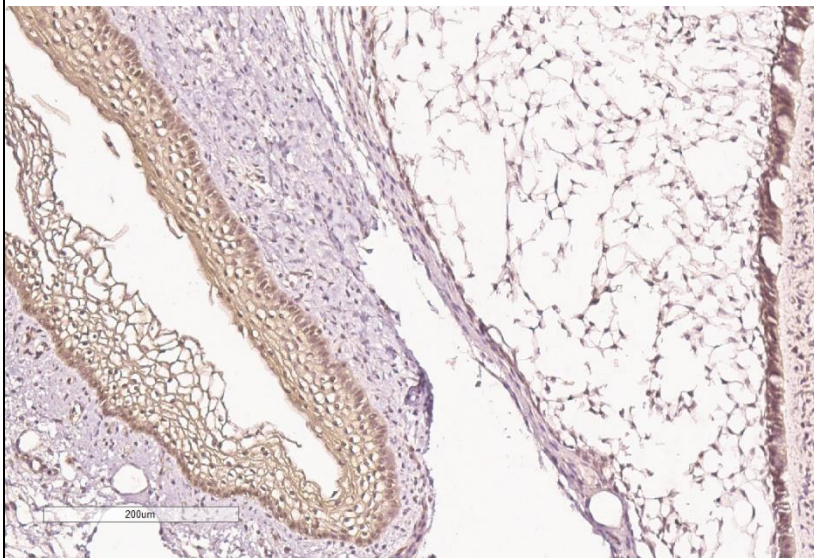
Клетките на слезните жлезни ацини, както и на изходните им канали показват положителна реакция за ZBTB20 (Фиг. 6.6.20.)



Фиг. 6.6.21. Епително повлекло (*gubernaculum dentis*), имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20

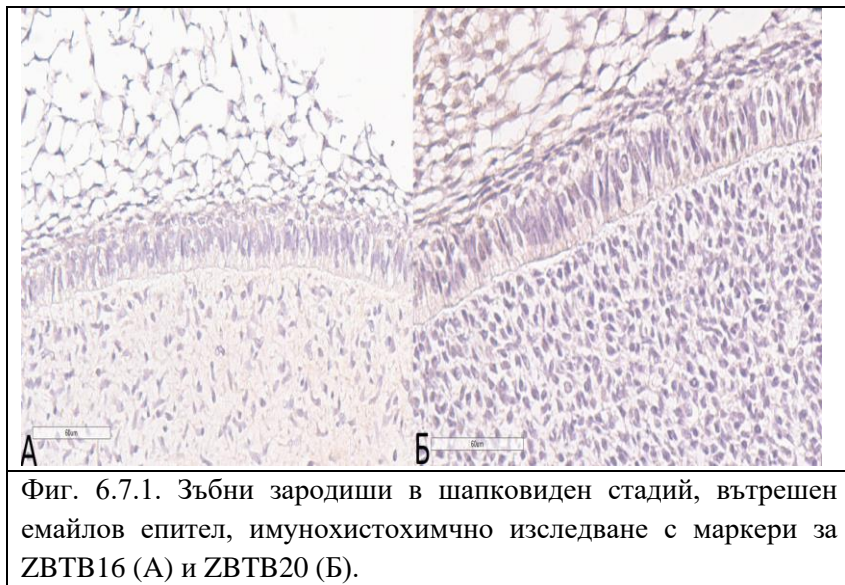
Епителното повлекло, което свързва денталния орган с оралния епител показва отчелива положителна реакция за ZBTB20 (Фиг. 6.6.21.).

Оралният епител показва положителна реакция, като тя е най-силна при герминативния слой (Фиг. 6.6.22.)



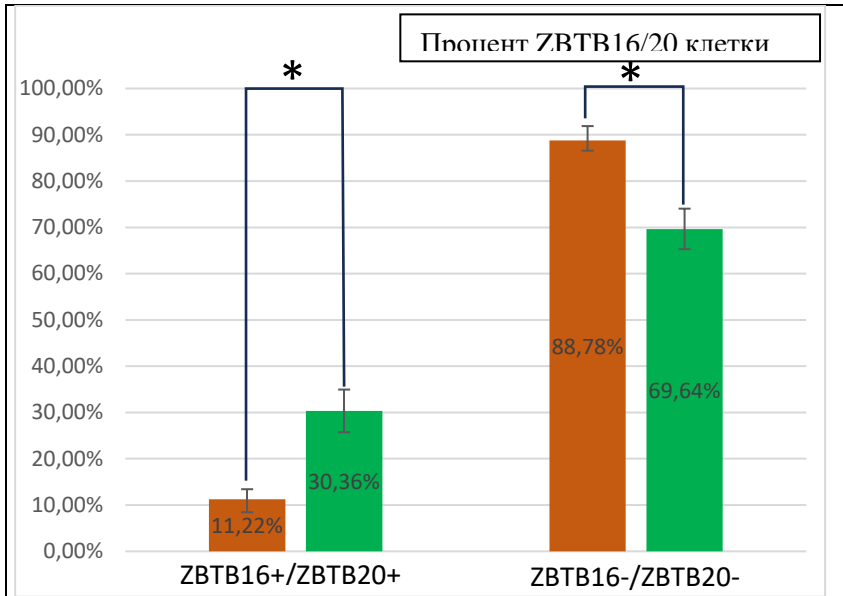
Фиг. 6.6.22. Орален епител, имунохистохимично изследване с маркер за ZBTB20 .

## 6.7. Сравнение между ZBTV16 и ZBTV20



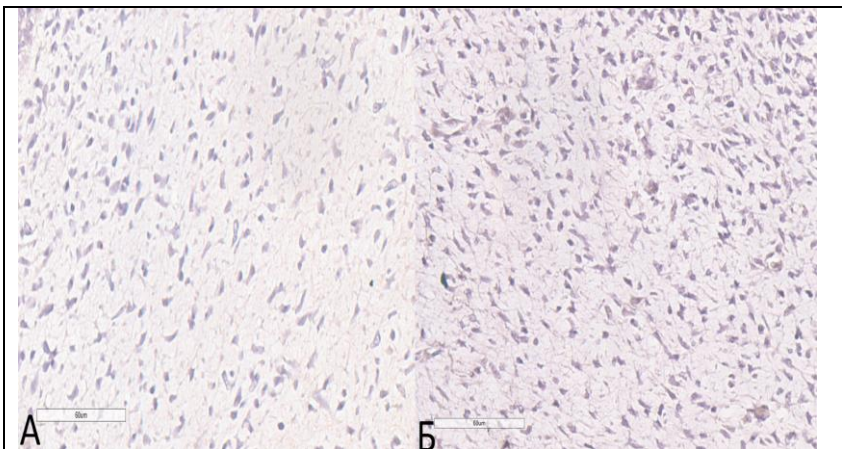
Фиг. 6.7.1. Зъбни зародиши в шапковиден стадий, вътрешен емайлов епител, имунохистохимчно изследване с маркери за ZBTV16 (А) и ZBTV20 (Б).

На шапковиден стадий (Фиг. 6.7.1.) процентът на положителните клетки при вътрешния емайлов епител, където клетките са слабо диференцирни е по-висок при ZBTV20 – 30,36%, отколкото при ZBTV16 – 11,22% (Фиг. 6.7.2.). Прави впечатление отчетливата положителна реакция за ZBTV20 и при останалите компоненти на емайловия орган – интермедиерен епител, звездовиден ретикулум и външен емайлов епител, която при ZBTV16 е отрицателна.



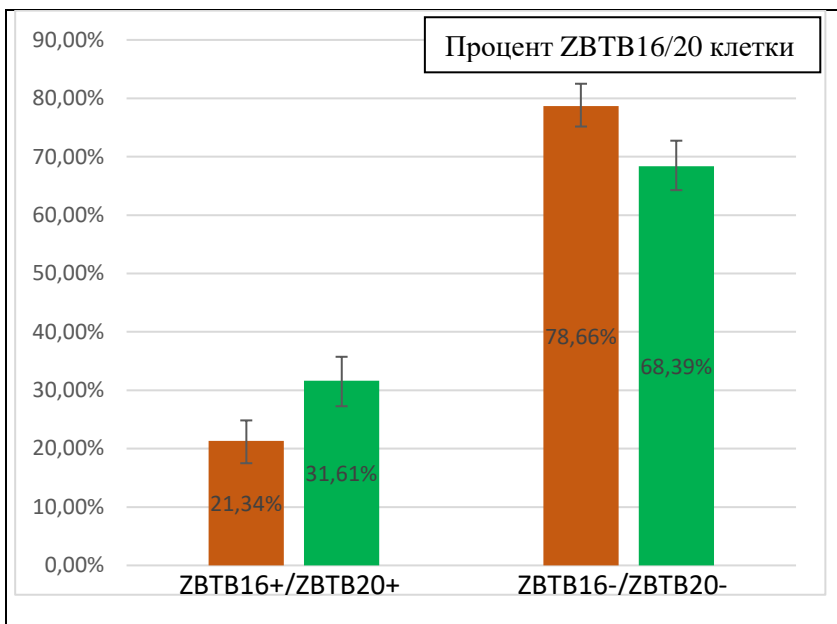
Фиг. 6.7.2. Процент Zbtb16+/Zbtb20+ положителни и Zbtb16-/Zbtb20- клетки от хематоксилин позитивни ядра при вътрешния емайлов епител.

\* $p < 0,05$



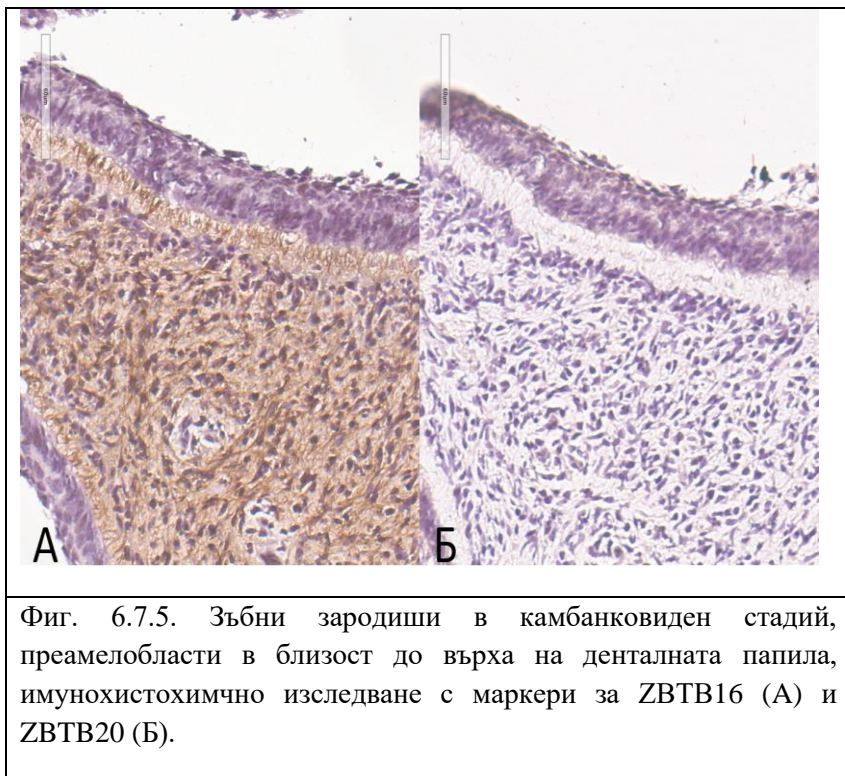
Фиг. 6.7.3. Зъбни зародиши в шапковиден стадий, дентална папила, имунохистохимчно изследване с маркери за ZBTB16 (А) и ZBTB20 (Б).

На същия шапковиден стадий при денталната папила (Фиг. 6.7.3.) няма сигнификантна разлика между процента ZBTB16+/ZBTB20+ клетки (Фиг.6.7.4.)

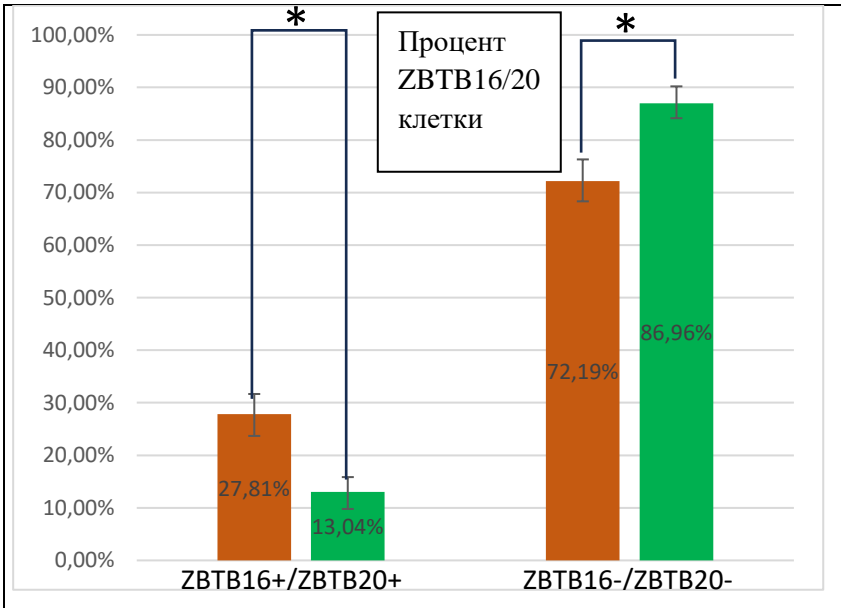


Фиг. 6.7.4. Процент ZBTB16+/ZBTB20+ и ZBTB16-/ZBTB20-клетки от хематоксилин позитивни ядра при денталната папила. \*p>0,05

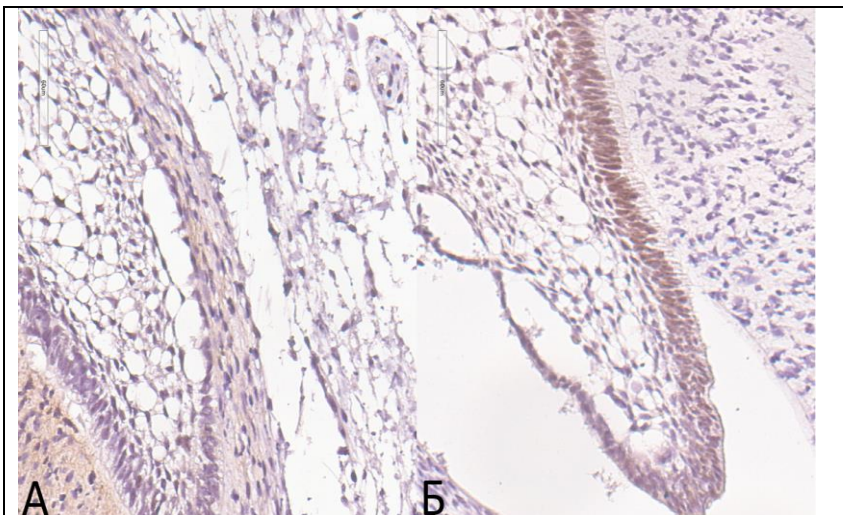




На следващия камбанковиден стадий, при върха на денталната папила, започва трансформацията на клетките от вътрешния емалов епител в преамелобласти (Фиг. 6.7.5.). При това се забелязва реципрочно покачване на ZBTB16+ клетки – 27,81% и намаляване на ZBTB20+ клетки – 13,04% (Фиг. 6.7.6.).

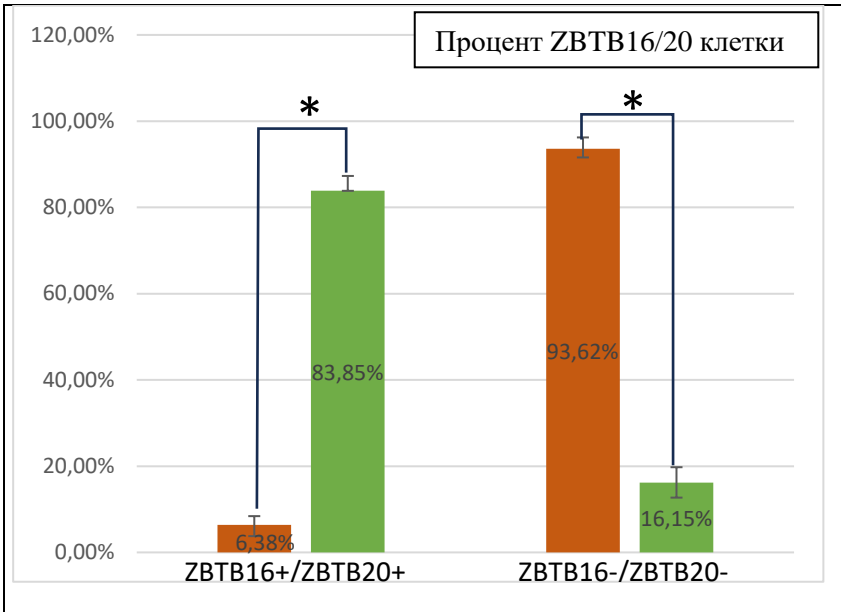


Фиг. 6.7.6. процент ZBTB16+/ZBTB20+ и ZBTB16-/ZBTB20-клетки от хематоксилин позитивни ядра при преамелобластите.  
\* $p < 0,05$



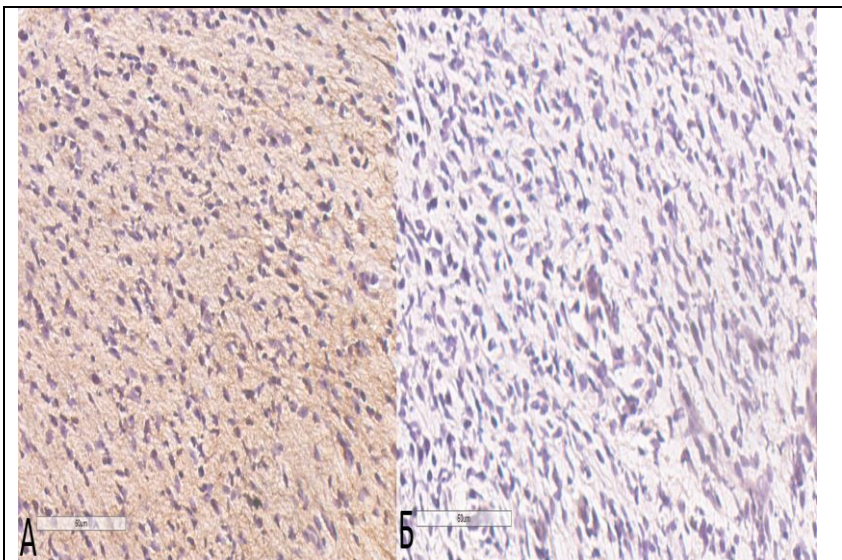
Фиг. 6.7.7. Зъбни зародиши в камбанковиден стадий, преамелобласти в близост до цервикалната примка, имунохистохимчно изследване с маркери за ZBTB16 (А) и ZBTB20 (Б). Увеличение x40.

Интересно наблюдение е, че на този стадий при цервикалната примка, вероятно диференциацията на вътрешния емайлов епител в преамелобласти все още не е протекла (Фиг. 6.7.7.). Което оказва влияние на процентът клетки експресиращ двата фактора. ZBTB20 положителните клетки са драстично повишени – 83,85%, докато ZBTB16 положителните клетки са в много нисък процент – 6,38% (Фиг. 6.7.8.).



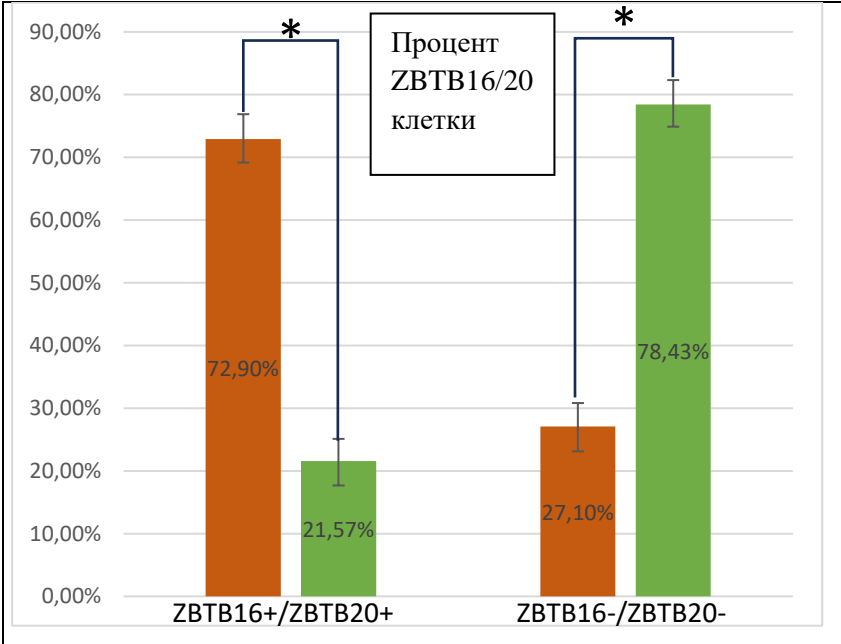
Фиг. 6.7.8. Процент Zbtb16+/Zbtb20+ и Zbtb16-/Zbtb20- клетки от хематоксилин позитивни ядра при преамелобласти в близост до цервикалната примка.

\* $p < 0,05$



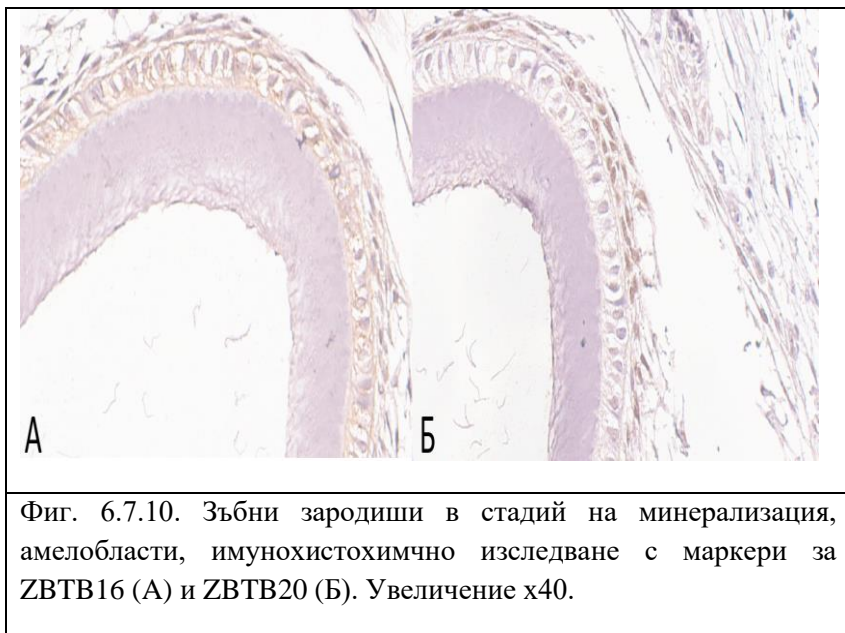
Фиг.6.7.9. Зъбни зародиши в камбанковиден стадий, дентална папила, имунохистохимчно изследване с маркери за ZBTB16 (А) и ZBTB20 (Б).

При камбанковидния (Фиг.6.7.9.) стадий денталната папила показва значително по-голям процент ZBTB16 позитивни клетки – 72,90% спрямо ZBTB20 позитивните – 21,57%, като прави впечатление силната цитоплазмена реакция при ZBTB16 позитивните клетки.



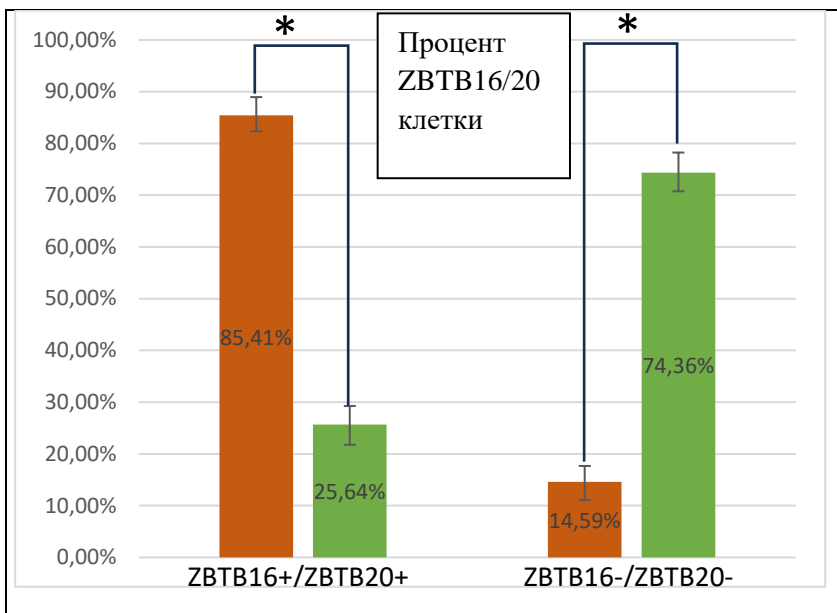
Фиг. Процент Zbtb16+/Zbtb20+ и Zbtb16-/Zbtb20- клетки от хематоксилин позитивни ядра в денталната папила.

\* $p < 0,05$



Фиг. 6.7.10. Зъбни зародиши в стадий на минерализация, амелобласти, имунохистохимчно изследване с маркери за ZBTB16 (А) и ZBTB20 (Б). Увеличение x40.

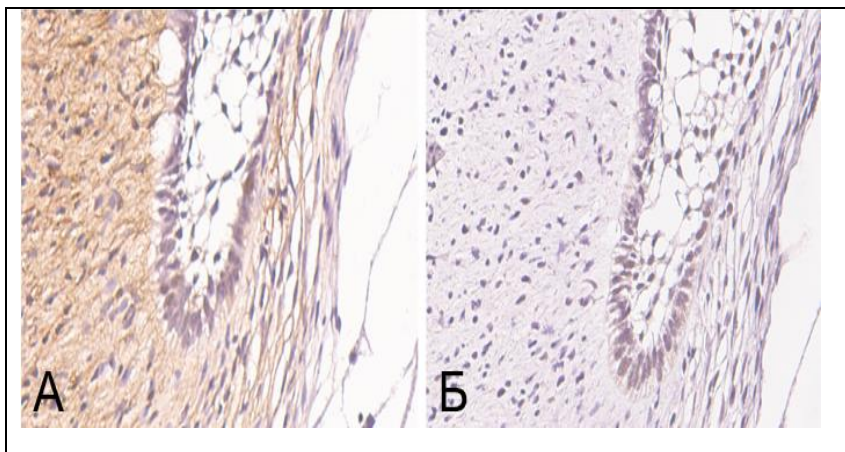
При стадият на минерализация имаме отложени минерални структури при върха на денталната папила – дентин и емайл (6.7.10) На фигурата наблюдаваме емайф, амелобласти и интермедиерен епител. Доста очевиден е високият процент ZBTB16 положителни клетки – 85,41% със силна цитоплазмена реакция сред амелобластите спрямо ZBTB20 положителните клетки сред тях – 25,64% (Фиг. 6.7.11.). Интермедиерният епител съдържа доста недиференцирани клетки, тъй като служи като клетъчен резерв на амелобластите и звездовидния ретикулум. При него се наблюдава обратното, силна положителна реакция за ZBTB20 и слаба за ZBTB16.



Фиг. 6.7.11. Процент Zbtb16+/Zbtb20+ и Zbtb16-/Zbtb20- клетки от хематоксилин позитивни ядра при амелобласти.

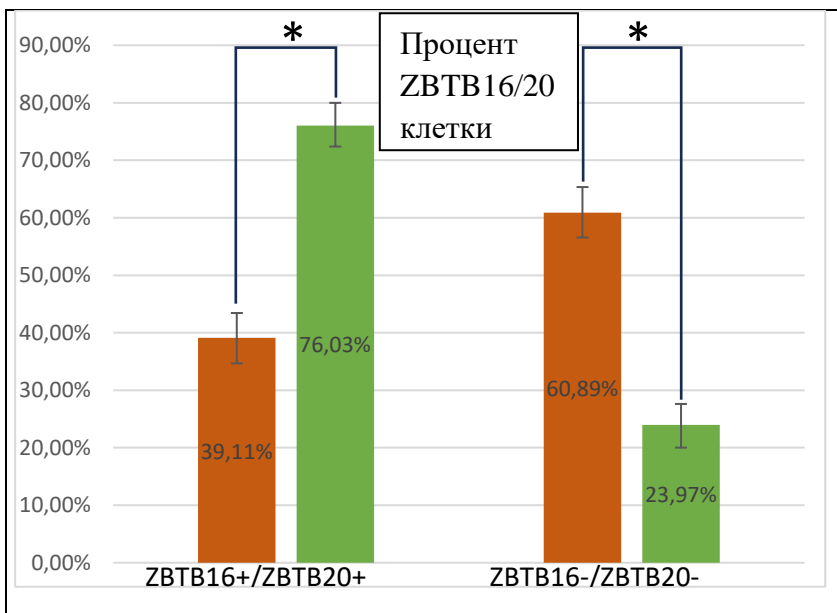
\*p < 0,05





Фиг. 6.7.12. Зъбни зародиши в стадий на минерализация, преамелобласти в близост до цервикалната примка, имунохистохимчно изследване с маркери за ZBTB16 (А) и ZBTB20 (Б) . Увеличение x40.

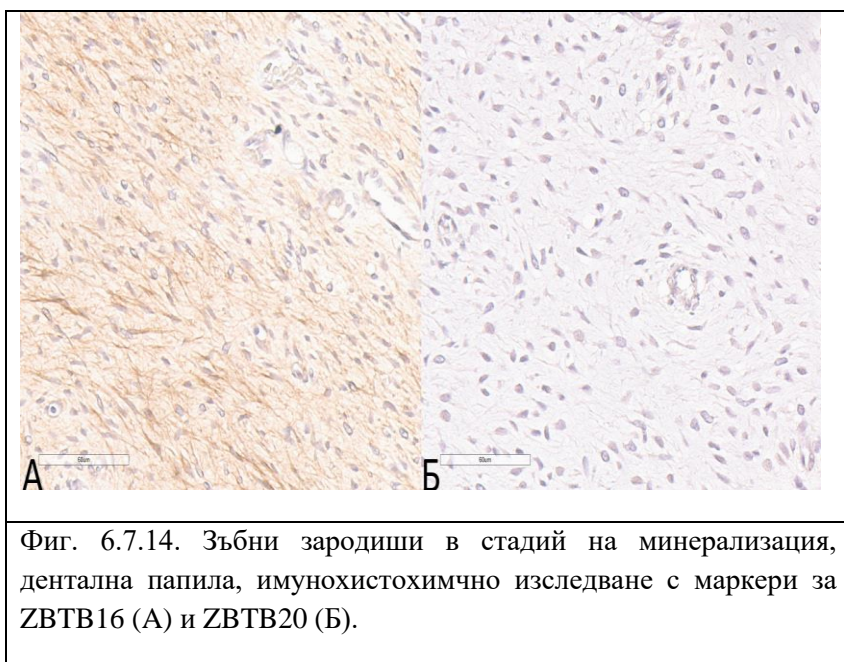
В областта на цервикалната примка, въпреки силната цитоплазмена реакция на околните денална папила и зъбна торбичка при оцветяването за ZBTB16 (Фиг.6.7.12.), преамелобластите показват висок процент ZBTB20 положителни клетки – 76,03% и по малък процент ZBTB16 положителни клетки – 39,11% (Фиг. 6.7.13). Тук клетките все още не са добре диференцирани, а и ще участват във формирането на влагалището на Хертвиг.

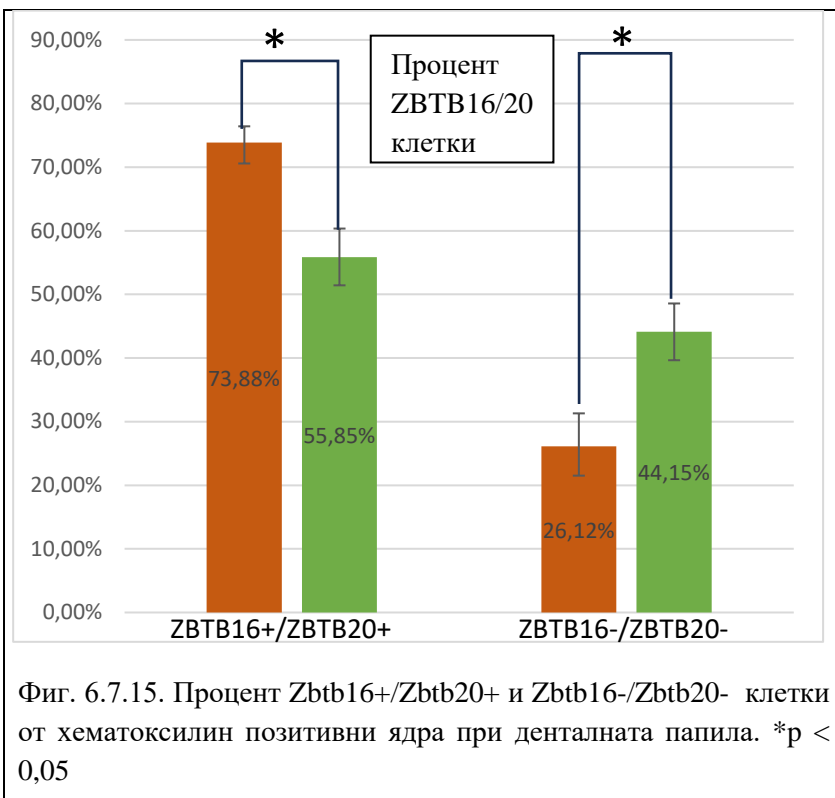


Фиг. 6.7.13. Процент Zbtb16+/Zbtb20+ и Zbtb16-/Zbtb20- клетки от хематоксилин позитивни ядра при преамелобласти в близост до цервикалната примка.

\*p < 0,05

В областта на зъбната торбичка отново имаме силна цитоплазмена реакция за ZBTB16 (Фиг.6.7.14.) Въпреки, че процентът на ZBTB16 е по-висок – 73,88%, процентът на ZBTB20 положителните клетки също показва ръст – 55,85% (Фиг. 6.7.15.).





На Фиг. 6.7.16 са показани обобщени данни на резултатите, от която е видима общата тенденция на ZBTB20 и Ki67 да показват сходна експресия в различните стадий и области на човешките зъбни зародиши, докато ZBTB16 има различна тенденция в експресията си.

	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
ZBTV16	11%	21%	28%	6%	73%	85%	39%	74%
ZBTV20	30%	32%	13%	84%	22%	26%	76%	56%
Ki67	33%	35%	10%	79%	19%	2%	90%	61%

Фиг. 6.7.16. Обобщен табличен вид на получените данни в проценти за положителните клетки при различните фактори, стадии и региони на зъбните зародиши.

А) Стадий на зъбна шапка – вътрешен емайлов епител

Б) Стадий на зъбна шапка – дентална папила

В) Стадий на зъбна камбанка – преамелобласти при върха на денталната папила

Г) Стадий на зъбна камбанка – вътрешен емайлов епител в областта на цервикалната примка

Д) Стадий на зъбна камбанка – дентална папила

Е) Стадий на минерализация - амелобласти

Ж) Стадий на минерализация - преамелобласти

З) Стадий на минерализация - дентална папила

## 7. Дискусия

В настоящото изследване за пръв път показваме експресията на транскрипционните фактори ZBTB16 и ZBTB20 в зъбни зародиши на човек на различна степен от пренатално развитие.

Голямото семейство ZBTB се състои от разнообразна група от 49 транскрипционни фактора и много от тях имат критично важна роля по отношение на диференциацията и ефекторната функция на хемопоеичните клетки, както и в други органи и системи по време на развитието, включително нервната, ендокринна и мускулната (Jiangyuan Liu, Nan Zhang, 2024).

При хората семейството на ZBTB се състои от голяма група TF, много от които служат като главни регулатори на събитията в развитието. Сред тях BCL6 транскрипционният репресор (BCL6), известен също като ZBTB27, е отличителен член, контролиращ формирането на зародишния център (GC) и диференциацията на T фоликуларните помощни клетки. За разлика от това, ZBTB16 насочва функцията и развитието на естествените T-клетки убийци. ZBTB20 води диференциацията на плазматичните клетки, но ограничава диференциацията на T-клетките на клетъчната памет. ZBTB32 е от съществено значение за пролиферацията на NK клетките и ограничава продължителността на реакциите на клетъчна памет. Поради тяхната основна роля в хематопоезата и имунните отговори, не е изненадващо, че аномалната експресия или дисфункция на ZBTB протеини води до хематологични злокачествени заболявания. Действително, първият характеризирания ZBTB протеин на бозайник е от изследването на хромозомни транслокации при човешка остра промиелоцитна левкемия

(APL). Анализът на t (11;17) транслокацията от случай с APL доведе до откриването на ZBTB16, който е слят с рецептора на ретиноевата киселина алфа (RARA), което води до най-лошата прогноза при APL. Друг пример е нерегулираната експресия на BCL6, която не само причинява развитие на В-клетъчен лимфом, но също така допринася за инициране на левкемия. Следователно BCL6 се превърна в привлекателна терапевтична цел за В-клетъчни лимфоми и левкемии. В допълнение към хематологичните злокачествени заболявания, протеините от семейството на ZBTB също участват в скелетни аномалии, безплодие и неврологични разстройства.

От членовете на ZBTB семейството, ZBTB20 кодира 741-остатъчен протеин с N-терминален BTV домейн и 5 C2H2-тип ZF домейна в C края. Конкретно, ZBTB20 е локализиран на хромозома 3, където се намира BCL6 и споделя висока хомология с BCL6 с идентичност от 56% в BTV домейна и 40% в C2H2-тип ZF домейна; по-специално, ZBTB20 е широко експресиран в хематопоеичните тъкани. Тези прилики предполагат, че ZBTB20 може да бъде много близо до BCL6 с определена роля в хемопоезата, имунните отговори и онкогенезата (Jiangyuan Liu, Nan Zhang, 2024).

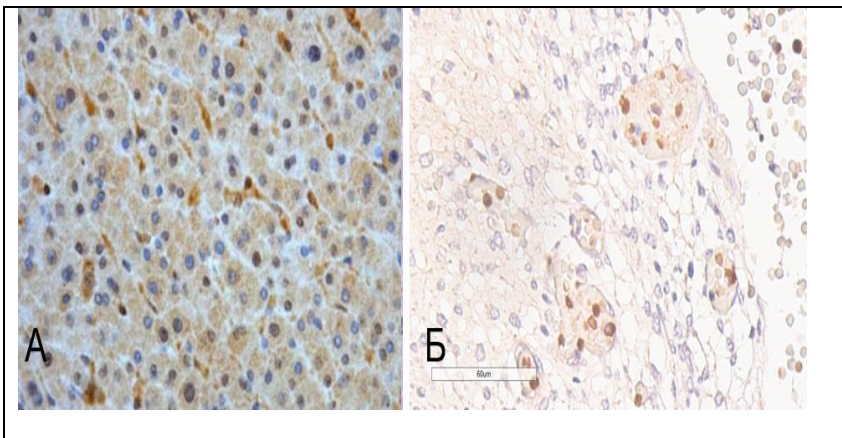
ZBTB16 и ZBTB20 показват широка застъпеност в много тъкани и органи в различни периоди от развитието, като тяхната експресия е добре представена в ЦНС. Известно е че развитието на зъбите е класически пример за епително-мезенхимно взаимодействие, а главовият мезенхим от своя страна произлиза от невралните гребени, което поставя въпроса за експресията на тези гени при развитието на зъбите. Известно е, че споменатите два фактора имат отношение към развитието на клетъчния цикъл при клетките в нервната система. Тяхната експресия в клетките на зъбния зародиш създава логическата нишка, че е

възможно прогениторните клетки, които се намират в него да имат потенциала да се диференцират в нервнотъканни клетки или друг вид клетки при които се експресират тези фактори.

ZBTB20 първоначално е идентифициран в човешки дендритни клетки и е широко експресиран в хемопоетични тъкани, включително слезка, лимфни възли, тимус, периферни кръвни клетки (Фиг. 7.1.) и фетален черен дроб. Установена е ролята му при развитие на някои видове рак, като хепатоцелуларен карцином, рак на стомаха, рак на ЦНС, левкемии (Jiangyuan Liu, Nan Zhang, 2024).

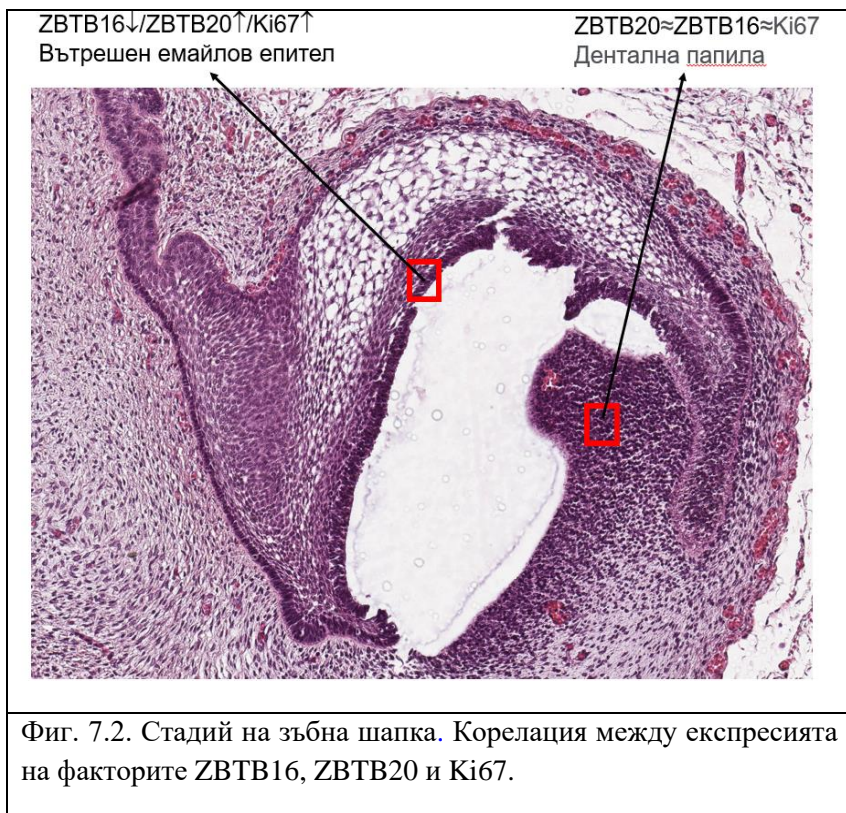
Като главен регулатор на лимфоидното развитие и диференциация, ZBTB20 играе ключова роля в имунния отговор и възпалението (Jiangyuan Liu, Nan Zhang, 2024). Васкуларизацията на зъбния зародиш от върха към основата през поредните стадии от развитието му вероятно има връзка с ролята на ZBTB20, като регулатор на клетъчния цикъл и клетъчната диференциация.



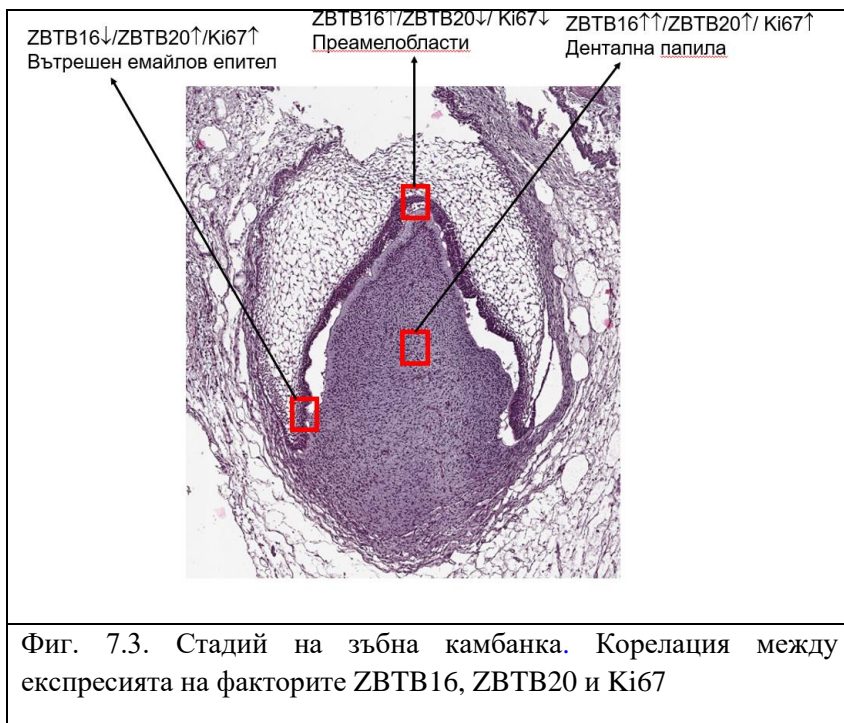


Фиг. 7.1. (А) ZBTB20 позитивни кръвни клетки в синусоидите на здрав черен дроб (Qing Wang, 2011.) (Б) Зъбен зародиш в камбанковиден стадий, ZBTB20 положителни кръвни клетки в съдове при основата на зъбния зародиш.

Нашите резултати показват, че в стадий на зъбна шапка има по-ниско ниво на експресия на ZBTB16 при вътрешния емайлов епител, за разлика от ZBTB20 и Ki67, всеки от които има високо ниво. При денталната папила няма сигнификантна разлика в експресията им (Фиг. 7.2.). Тези резултати показват, че ZBTB20+ клетки често пролиферират, докато ZBTB16+ клетки демонстрират тенденция към по-зрял фенотип с по-ниски нива на пролиферация.



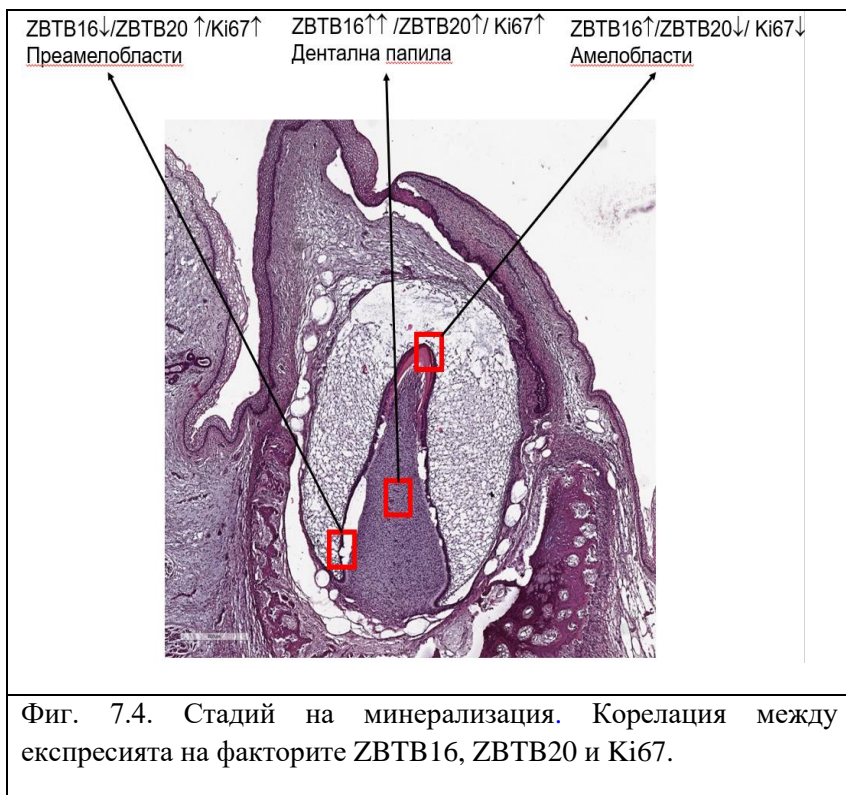
Корелацията между ZBTB20 и Ki67 се запази и при стадий на зъбна камбанка. Както ZBTB20, така и Ki67 показаха висок процент на експресия в клетките от вътрешния емайлов епител, докато ZBTB16 бе експресиран от малък процент от тези клетки (Фигура 7.3.). В същото време ZBTB16 имаше по-ниска експресия в клетките от цервикалната примка, които са по-недиференцирани, докато експресията на ZBTB16 в епитела на върха на папилата бе по-висока (Фигура 7.3.).



Тези резултати показват, че и в стадия на зъбната камбанка ZBTB20+ клетки често пролиферират (експресията им корелира с Ki67), докато ZBTB16+ клетки се представят с по-зрял фенотип, с по-ниски нива на пролиферация. При клетките на денталната папила на стадий зъбна камбанка, обаче, има високи нива на експресия както на ZBTB16, така и на ZBTB20 и Ki67 (Фигура 7.3.), което е различно спрямо предходия стадий, когато високи нива на експресия имаха само ZBTB20 и Ki67 (Фиг. 7.2.).

Това показва, че експресията на ZBTB16 и ZBTB20 се променя динамично в зависимост от стадия на развитие и анатомичната локализация в зъбния зародиш.

При стадия на минерализация има много силно повишаване на позитивната реакция за ZBTB16 сред амелобластите и клетките на денталната папила и сравнително ниска сред преамелобластите. Обратно на ZBTB16, ZBTB20 и Ki67 показват повишаване в денталната папила спрямо предишния стадий, но противоположна характеристика на експресията си в амелобласти/преамелобласти спрямо ZBTB16. При амелобластите ZBTB20 и Ki67 показват ниски нива на експресия, доакто при преамелобластите експресията е висока (Фиг. 7.4.).



Тези резултати потвърждават тезата за динамичния характер на промяната в експресията на ZBTB16 спрямо ZBTB20 в зависимост от стадия на развитие и анатомичната локализация в зъбния зародиш (Фигура 7.4).

## 8. Заключение

Транскрипционните фактори ZBTB16 и ZBTB20 имат динамичния характер в експресията си в зъбния зародиш при човек, като експресията се променя в зависимост от стадия на развитие и анатомичната локализация.

ZBTB16 се експресира предимно от клетки, които са завършили своята диференциация. При ZBTB20 реакцията е положителна най-вече в зоните с прогениторни клетки и съответно може да служи като маркер за тяхната локализация. В мезенхима на зъбната папила и двата транскрипционни фактора имат силна експресия. Тези резултати подчертават темпоралната и регионална зависимост на експресията и са основа за бъдещи експерименти, които да открият функционалните ефекти от експресията на ZBTB16 и ZBTB20 в зъбните зародиши при човек.

## 9. Изводи

9.1. По време на пренаталното развитие на зъб при човек Kі67-положителни клетки се откриват основно сред преамелобластите, прогениторните клетки в денталната папила, в базалния слой на оралния епител, както и сред клетките на космената луковица на прилежащата около зъбния зачатък кожа.

9.2. По време на пренаталното развитие на зъб при човек ZBTB16- положителните клетки се увеличават постепенно по време на развитието: в по-ранен стадий (зъбна шапка) са в малко количество и постепенно се увеличават през стадията на зъбна камбанка и минерализация.

9.3. Клетките, в които ZBTB16 има най-силна експресия са тези при върха на папилата, като диференцираните амелобласти, както и в самата дентална папила. Останалите зони на емаловия орган са отрицателни за ZBTB16.

9.4. Клетките на космените фоликули показват положителна реакция за ZBTB16, докато сърцевината на космената луковица е отрицателна.

9.5. По време на пренаталното развитие на зъб при човек ZBTB20-положителните клетки търпят плавно увеличение по време на развитието, като положителните клетки са хомогенно разпределени в папилата и показват сходен интензитет на реакцията.

9.6. Клетките, в които ZBTB20 има най-силна експресия са тези при основата на папилата, като недиференцираните

преамелобласти, както и в самата дентална папила, докато в диференцираните амелобласти почти липсва експресия.

9.7. При оралния епител, най-силна положителна реакция за ZBTB20 има в клетките от базалния слой, докато при по-диференцираните спинозни клетки от интермедиерен и повърхностен слой реакцията е по-слаба. При космените фоликули положителна за ZBTB20 беше само вътрешната космена обвивка.



## **10.Справка за приноса на дисертационния труд**

10.1. За първи път се изследва експресията на транскрипционните фактори ZBTV16 и ZBTV20 в зъбен зародиш на човек на различни стадии от развитието.

10.2. За първи път се доказва, че ZBTV16 и ZBTV20 могат да бъдат използвани като маркери за степента на диференциацията на клетки и структури на зъбния зародиш.

10.3. За първи път се демонстрира темпорално и регионално-зависима динамична експресия на транскрипционните фактори ZBTV16 и ZBTV20 послужиха за точна локация на прогениторните клетки в конкретни структури и при конкретни стадии.

10.4 За първи път се открива способността на транскрипционен фактор ZBTV20 да маркира прогениторни клетки за емайл.

10.5 За първи път се открива способността на транскрипционен фактор ZBTV16 да маркира зрели клетки, продуциращи емайл.

## 11. Публикации и доклади във връзка с дисертационния труд

1. В. Parvanov. Пиер Фошар – бащата на съвременната дентална медицина. Асклепий. Международно списание по история и философия на медицината том 14 брой 1
2. В. Parvanov, АВ Tonchev. Anatomical description in the fundamental work of dentistry. Varna Medical Forum 11 (1), 160-166
3. В. Parvanov, АВ Tonchev. Molecular mechanisms of dental development in humans. Varna Medical Forum 11 (1), 167-174

## 12. Благодарности

Благодаря на моя научен ръководител Проф. д-р Антон Тончев д.м.н. за огромната подкрепа, разбиране и вяра в мен, които допринесоха до голяма степен за кариерното ми и лично развитие и ми създадоха мироглед, който е безценен.

Благодаря на семейството си за помощта, подкрепата и вярата в мен.

Благодаря на лаборантите Велина Кеновска и Елена Боева за проявената отговорност и положения труд при изготвянето на хистологичните препарати.

Благодаря на д-р Павел Павлов, д-р Явор Павлов и д-р Димо Стоянов, за техническата помощ, която ми оказаха.

Благодаря на препараторите Лилия Даскалова, Диляна Димитрова и Милена Христова, за помощта оказана при воденето на дисекционните упражнения.

Благодаря на колегите от катедра „Анатомия и клетъчна биология“ за топлата и благоприятна работна среда, както и за всеобщата подкрепа, която оказаха при начинанията ми.

Благодаря на колегите от административния отдел Галина Ангелова и Ива Даскалова за добрата организация и постоянната готовност за помощ.

Благодаря на д-р Марин Железов за професионалната и приятелска атмосфера в кабинета.

