

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТИПОВ КОЛОНИЙ КОЕ-Ф ПУЛЬПЫ ЗУБА И СТВОЛОВЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Как известно, пульпа зуба представляет собой соединительнотканное образование, имеющие, как и кость, мезодермальное происхождение. Пульпа представлена клетками, основным веществом и волокнами. Основные клетки пульпы — это фибробласты, одонтобласты, гистиоциты, недифференцированные мезенхимальные клетки, лимфоидные блуждающие клетки, перicyты.

Фибробласты пульпы аналогичные фибробластам соединительной ткани в других органах тела человека. Они имеют веретенообразную форму. Фибробласты и одонтобласты происходят от мезенхимной ткани, но одонтобласты представляют собой более дифференцированные клетки пульпы.

Морфологически одонтобласты представлены длинными колонкообразными клетками в коронковой пульпе и короткими колонкообразными клетками в середине корня. В области корня клетки короче и по своей форме напоминают куб, а ближе к верхушке корня клетки сплюсываются и приближаются по своей форме к фибробластам. Причем, ядро типичного одонтобласта имеет форму эллипса. Отростки одонтобластов или волокна Томса могут быть представлены тонкостенными трубками или твердой сплошной массой. Они содержат липиды и щелочную фосфатазу. Ядра одонтобластов соприкасаются с соседними клетками и с клетками, расположенными ближе к центру пульпы, через тонкие отростки протоплазмы и они рассматриваются как часть мезенхимального синцития. Если происходит повреждение одного одонтобласта, то страдают и другие. Под слоем одонтобластов в коронковой части пульпы расположен слой Вейля — зона, бедная клеточными ядрами, содержащая многочисленные отростки клеток, а также сеть нервных волокон (сплетение Рашкова) и кровеносные капилляры, которые окружены коллагеновыми и ретикулярными волокнами, погруженными в основное вещество. За зоной Вейля располагается слой, богатый клетками: фибробластами, недифференцированными мезенхимальными клетками. Последние при повреждении одонтобластов способны трансформироваться в одонтобластоподобные клетки. Еще в 1962 году Stanley говорил о фигурах митоза в дифференцирующихся клетках

пульпы непосредственно под пораженным участком.

Гистиоциты находятся вблизи кровеносных сосудов. Их называют блуждающие клетки в покое. Они имеют длинные изгибные тонкие разветвляющиеся отростки, которые при необходимости они способны утратить, превращаясь в макрофаги.

Недифференцированные мезенхимальные клетки пульпы способны при определенных условиях превращаться в макрофаги, фибробласты и остеокласты. Таким образом, недифференцированные мезенхимальные клетки составляют клеточный резерв пульпы, которому организм задал необходимые функции, в зависимости от условий.

Волокна пульпы не отличаются от таковых соединительнотканых волокон других органов. Так, межклеточное пространство, а также область вокруг кровеносных сосудов и одонтобластов выполнены ретикулиновыми волокнами, которые могут превращаться в коллагеновые волокна.

Тонкие аргирофильные волокна образуют спиралевидные переплетенные пучки, проходя между одонтобластами и выходя в виде тонкой сетки (волокна Корфа), образуя фибриллярную основу дентина. По окраске они подобны волокнам кости и соединительной ткани. Волокна Корфа имеют коллагеновое происхождение.

Рисунок коллагеновых отложений в пульпе может быть двух видов: 1) диффузный, в нем коллагеновые волокна расположены без ориентации, хаотично и 2) пучковый — в нем большие грубые пучки идут параллельно нервам или самостоятельно. Коронковая часть пульпы в большей степени представлена пучковым коллагеном.

Основное вещество пульпы состоит из протеина в сочетании с гликопротеинами и мукополисахаридами. Обмен веществ в клетках и волокнах пульпы проходит через основное вещество. Engel описал его как «внутреннюю среду», через которую проходят метаболиты из кровяного русла к клеткам, а продукты распада из клеток обратно в венозную кровь. Прежде, чем питательные вещества попадут в клетку, они растворяются в основном веществе пульпы. Таким же образом вещества, выделяемые клеткой, проходят через основное вещество, прежде чем попасть в концевые сосуды. Иными словами, обменная роль ос-

новного вещества непосредственно влияет на жизнеспособность пульпы.

Таким образом, пульпа — это сложная и многогранная структура, которая не только обеспечивает образование и трофику дентина, но и выполняет сенсорную, защитную и репаративную функции.

Рассматривая зуб как составную часть скелета с 10-летним циклом полного обновления, и учитывая, что пульпа зуба является аналогом костного мозга длинных трубчатых костей, можно предположить, что каждые 10 лет все ткани зуба должны полностью обновиться. Следовательно, учитывая особенности строения и функции зубов, их можно рассматривать как специализированный костномозговой орган. При этом, для обеспечения заданного темпа обновления в зубе, как и в любой другой кости, имеются клетки-предшественники как источник постоянного обновления, а локализоваться они должны в пульпе зуба точно так, как остеогенные клетки-предшественники в костном мозге. Следовательно, с целью изучения различных процессов в тканях зуба в современных исследованиях можно использовать анализ состояния производных клеточных популяций этих тканей как при физиологическом состоянии, так и при патологических процессах (1, 2, 3).

Известно, что цитохимические исследования позволяют оценить активность клетки и направленность ее дифференцировки. Щелочная фосфатаза является маркерным ферментом остеобластов, принимает участие в оссификации кости и хряща³⁰⁻³². Наличие этого фермента в клетках культуры костного мозга является признаком их остеогенной дифференцировки и свидетельствует об активном синтезе коллагена^{33,34}.

Цель настоящего исследования — изучить типы колоний, образованных колониеобразующими единицами фибробластов (КОЕ-Ф) пульпы зуба в сравнении с типами колоний КОЕ-Ф стволовых стромальных клеток костного мозга человека в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Для изучения остеогенной активности клеток костного мозга и пульпы человека изучали колонии фибробластов, полученные путем клонирования остеогенных клеток-предшественников *in vitro*

с использованием метода клонирования КОЕ-Ф костного мозга и клеток пульпы по методике Астаховой В.С.^{20, 21, 22}. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) — маркерного фермента остеобластов, определяли по методу Karlow²³. За колонию принимали скопление клеток, содержащее не менее 50 фибробластов. Исследовали пульпу здоровых зубов, удаленных по ортодонтическим показаниям.

Результаты

В культурах КОЕ-Ф из пульпы зубов вырастали как однослойные, так и многослойные колонии. Многослойные колонии по своему структурообразовательному потенциалу напоминали колонии КОЕ-Ф костного мозга, клетки колоний, выросшие из пульпы зуба, по морфологическим и цитохимическим признакам не отличались от костномозговых предшественников.

В результате исследования в культуре клеток из пульпы зубов, было выделено 6



Рис. 1. Колония КОЕ-Ф I типа из пульпы зуба человека



Рис. 2. Колония КОЕ-Ф III типа из пульпы зуба человека

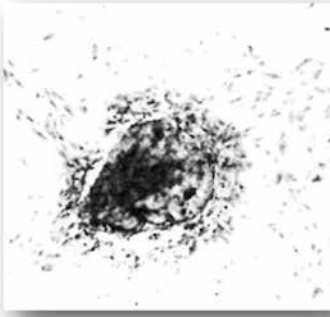


Рис. 3. Колония КОЕ-Ф IV типа из пульпы зуба человека

основных типов колоний КОЕ-Ф, которые характеризовались различной структурообразовательной и остеогенной активностью.

Колония КОЕ-Ф I типа. Колония имеет несколько центров, из которых выходят ряды клеток и располагаются тангенциально, образуя линии (рис. 1). По периферии колонии клетки расположены под углом друг к другу, образуя сетку. В данной колонии преобладают веретенообразные клетки (до 40%).

Колония КОЕ-Ф II типа. По взаимоположению клеток колония напоминает IV тип роста остеогенных клеток-предшественников костного мозга. Отложение солей кальция в колонии происходит в основном по ее периферии. В отличие от IV типа островки расположены близко друг к другу, при этом трудно различить их центры. Островки как бы переходят друг в друга. При этом клетки, образующие их, расположены хаотично. По краю колонии клетки рассредоточены и располагаются на большом расстоянии и под углом друг к другу. В данной колонии преобладают веретенообразные (до 31%) и треугольные клетки (до 26%).

Колония КОЕ-Ф III типа. По структуре колония напоминает V тип роста остеогенных клеток-предшественников костного мозга (рис. 2). В отличие от пятого типа только часть клеток накладываются друг на друга. Колония содержит большое количество распластаных клеток. В данной колонии преобладают веретенообразные (до 32%) и треугольные клетки (до 21%).

Колония КОЕ-Ф IV типа. Клетки расположены хаотично и под различными углами друг к другу (рис. 3). Клетки образуют линии, они объединяются и их группы располагаются под различными углами к другим группам. По периферии клетки располагаются на большом расстоянии друг от друга. В данной колонии преобладают многоотростчатые клетки (до 42%).

Колония КОЕ-Ф V типа. Нет четкости во взаимоположении клеток. Они расположены под различным углом друг к другу. Некоторые из них группируются, образуя узелки. Однако четкого разграничения между ними нет. Все клетки в колонии расположены хаотично. В данной колонии преобладают многоотростчатые клетки (до 62%).

Колония КОЕ-Ф VI типа. Клетки располагаются различными углами друг к другу. Они группируются, образуя сеть, которая напоминает III тип роста остеогенных клеток-предшественников костного мозга. В отличие от III типа сети накладываются друг на друга, поэтому сложно рассмотреть форму клеток. По периферии колонии расположено большое количество треугольных клеток с длинными отростками. Отдифференцировать виды клеток не представляется возможным, в связи с их плотной упаковкой в данной колонии.

Особенностью роста колоний КОЕ-Ф из пульпы зуба является то, что во всех многослойных колониях произошло отложение большого количества солей кальция по

площади всей колонии.

Таким образом, разные виды клеток в различном процентном количестве формируют разные типы колоний КОЕ-Ф пульпы зуба человека. Как видно из табл. 1, веретенообразные клетки встречаются в первых трех типах колоний и являются их основными клетками, они составляют в среднем 1/3 колоний I–III типов, в то время как остальные виды клеток находятся в них в разном процентном количестве. Характерной особенностью этих колоний является то, что все они содержат круглые клетки в незначительном количестве (от 0,25% до 1,8%). Активность ЩФ в круглых клетках либо отсутствовала полностью, либо была невысокой. По морфологии эти клетки были практически идентичны прикрепившимся клеткам в первые сутки культивирования.

Веретенообразные клетки, составляющие основу первых трех типов колоний, не все содержали продукты реакции на щелочную фосфатазу. Активность фермента в этих клетках была наиболее низкой по сравнению с другими видами.

Веретенообразные клетки с крупным ядром наиболее часто встречались в первом и третьем типах колоний, при этом все клетки содержали ЩФ. Однако интенсивность окраски продуктов реакции была различна в пределах одной и той же колонии.

Длинные веретенообразные клетки не встречались ни в одной колонии КОЕ-Ф пульпы зуба человека.

Отростчатые клетки, содержащие 2–3 отростка, практически в одинаковом процентном соотношении встречались в первых четырех типах колоний, в то время как в пятом типе количество этих клеток было практически в 2 раза меньше. Эти клетки имеют активность ЩФ как в теле, так и в отростках со средней интенсивностью окрашивания.

Многоотростчатые клетки в небольшом проценте случаев встречались в первых трех типах колоний, причем этот вид клеток составлял основу четвертого (42%) и пятого (62,2%) типов колоний. Эти клетки имели большую активность ЩФ по сравнению с предыдущими видами клеток.

Треугольные клетки, составляли на 17,8–26% колонии 1, 2 и 3 типов и на 11,8–18,75% колонии 4 и 5 типов имели самую высокую из всех описываемых видов клеток активность ЩФ.

Четырехугольные клетки с короткими отростками и большой цитоплазмой в небольшом проценте случаев встречались во 2, 4 и 5 типах (5,5%, 3,75% и 6,5% соответственно), а в колониях 1 и 3 типа встречались приблизительно в 11%. Эти клетки имели высокую активность ЩФ (рис. 4).

Обсуждение

Учитывая ранее проведенные исследования, культура КОЕ-Ф костного мозга человека представлена 6 основными типами колоний с разными остеогенными и структурообразовательными потенциалами, в состав которых входит 8 видов фибробла-

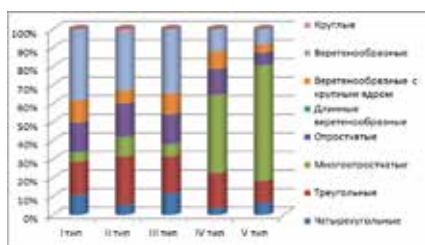


Рис. 4. Виды клеток, образующих колонии КОЕ-Ф пульпы зуба человека

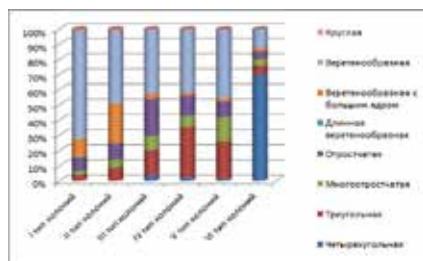


Рис. 5. Виды клеток, образующих колонии КОЕ-Ф пульпы зуба человека

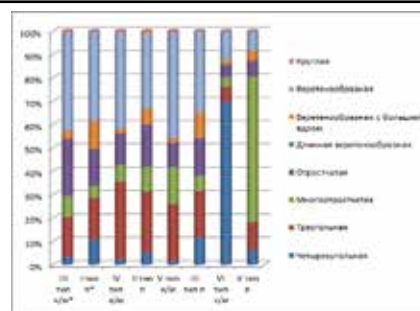


Рис. 6. Сравнительная характеристика типов колоний КОЕ-Ф костного мозга и пульпы зуба (n*) человека

стов, причем 6-й тип колоний характерен для стволовых стромальных клеток (ССК) костного мозга нижней челюсти. В первых трех типах колоний преобладают клетки с низкой степенью дифференцировки, в то время как колонии КОЕ-Ф 4-го, 5-го и 6-го типов образуются клетками с высокой степенью дифференцировки.

Как видно из табл. 2 в первых трех типах колоний КОЕ-Ф костного мозга человека преобладают клетки с низким содержанием ЩФ — круглые, веретенообразные, веретенообразные с большим ядром, длинные веретенообразные и отросчатые. Соответственно первый тип колонии содержит 93,4%, второй — 86%, третий — 70,5% таких клеток (рис. 5). В то время, как только первый тип колоний КОЕ-Ф из пульпы зуба человека содержит 66,2% подобных клеток. Как третий тип колоний КОЕ-Ф костного мозга, так и первый тип колоний КОЕ-Ф пульпы зуба в среднем содержали одинаковое количество треугольных и веретенообразных клеток. По характеру упаковки и расположению клеток первый тип колоний КОЕ-Ф пульпы был подобным третьему типу колоний КОЕ-Ф костного мозга.

Колоний КОЕ-Ф из пульпы зуба, которые были бы схожи с первым и вторым типом колоний КОЕ-Ф костного мозга, нами не было обнаружено.

Колоний КОЕ-Ф костного мозга человека четвертого пятого типов состоят практически на 3/5 из клеток с низким содержанием ЩФ, соответственно 57,1% и 58,1%. Среди различных типов колоний КОЕ-Ф пульпы зуба колонии второго и третьего типов также на 3/5 состояли из клеток с низким содержанием ЩФ. В четвертом типе колоний КОЕ-Ф костного мозга человека преобладали веретенообразные (40,8%) и треугольные (33,3%) клетки, а в колонии КОЕ-Ф пятого типа — 44,8% и 24,3% соответственно. В то время как колонии КОЕ-Ф пульпы зуба второго типа содержала 31,2% веретенообразных и 26% треугольных клеток, а колонии третьего типа — 34,38% и 20% соответственно.

По характеру упаковки и расположению клеток колонии КОЕ-Ф пульпы зуба второго типа напоминали колонии КОЕ-Ф костного мозга четвертого типа, а колонии КОЕ-Ф пульпы зуба третьего типа были подобны колониям КОЕ-Ф костного мозга пятого типа.

Колонии КОЕ-Ф костного мозга шестого типа состоят на 4/5 из клеток, имеющих высокую активность ЩФ (многоотростчатые, треугольные, четырехугольные клетки), большая часть данной колонии представлена четырехугольными клетками (70%). Среди типов колоний КОЕ-Ф пульпы зуба, как четвертый, так и пятый тип содержал большое количество клеток с высокой активностью ЩФ. Так, четвертый тип колоний КОЕ-Ф состоял на 3/5 (64,5%), а пятый — на 4/5 (80,5%) из таких клеток. В четвертом типе многоотростчатые клетки встречались в 42%, а в пятом — в 62,2%, в то время как четырехугольные клетки в данных колониях встречались всего лишь в 3,75% и 6,5% соответственно.

По характеру упаковки и расположению клеток колонии КОЕ-Ф пульпы зуба четвертого и пятого типов не имеют соответствия с типами колоний КОЕ-Ф костного мозга человека. Однако по количеству высокодифференцированных клеток пятый тип колоний КОЕ-Ф пульпы зуба схож с шестым типом колоний КОЕ-Ф костного мозга человека (рис. 6).

Таблица 1.

Виды КОЕ-Ф из пульпы зуба человека, образующие различные типы колоний

Виды клеток	I тип	II тип	III тип	IV тип	V тип
Четырехугольная	10,8	5,5	11,62	3,75	6,5
Треугольная	17,8	26	20	18,75	11,8
Многоотростчатая	5,2	10,5	6,5	42	62,2
Отростчатая	15,75	18	16	14	6,8
Длинная веретенообразная	-	-	-	-	-
Веретенообразная с большим ядром	12,2	7	11,25	9,5	4,5
Веретенообразная	38	31,2	34,38	12	8,2
Круглая	0,25	1,8	0,25	-	-

Таблица 2.

Виды КОЕ-Ф из костного мозга человека, образующие 6 основных типов колоний

Виды клеток	I тип	II тип	III тип	IV тип	V тип	VI тип
Четырехугольная	-	-	3,5	2,3	1,8	70
Треугольная	4,3	9	17	33,3	24,3	6,25
Многоотростчатая	2,3	5	9	7,3	15,8	4
Отростчатая	8,8	10,8	24,5	13,3	10,3	5,25
Длинная веретенообразная	0,5	-	-	-	-	0,25
Веретенообразная с большим ядром	11,8	26,2	3,5	2	2	2
Веретенообразная	70,3	46,7	41,5	40,8	44,8	12,25
Круглая	2	2,3	1	1	1	-

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

- По остеогенному и структурообразовательному потенциалам КОЕ-Ф пульпы зуба человека схожи с КОЕ-Ф костного мозга человека.
- В пульпе зуба человека находятся КОЕ-Ф, способные в культуре дифференцироваться с отложением солей кальция, причём с большей скоростью и интенсивностью, чем это наблюдается в культурах из костного мозга костей скелета.

• Культура клеток КОЕ-Ф из пульпы зуба человека была в основном представлена типами колоний, состоящих из высокодифференцированных клеток — 2–6 типы (5 из 6 типов). В то же время культура КОЕ-Ф из костного мозга человека была представлена только 4, 5 и 6 (нижняя челюсть) типами (3 из 6 типов), содержащими клетки с высокой степенью дифференцировки.

Последний факт может свидетельствовать о том, что зуб является тем значимым (важным) органом для функции кости, а от-

сюда — его высокий регенераторный потенциал в виде функциональных особенностей клеток пульпы, которые должны обеспечить сохранение зубов.

Далее, рассасывание кости альвеолярного отростка челюсти после утраты даже одного зуба может свидетельствовать не только о снижении значительного функционального напряжения на кость, но и поддержании репаративного потенциала костного мозга челюсти за счет репаративного потенциала клеток пульпы зуба.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алафх Хшам Пульпит: особливості розвитку та вибір методу лікування: автореф. на здобуття ступеню канд. мед. наук: спец. 14.01.22 «Стоматологія» / Алафх Хшам — Київ, 1993.
2. Астахова В.С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека. Киев. — 2000. — 172 с.
3. Астахова В. С. Дифференцировка стромальных клеток-предшественников костного мозга человека в монослойной культуре // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1985. — 1. — С.479-481.
4. Астахова В. С. Сравнительная оценка ксенофидеров при клонировании стромальных фибробластов костного мозга человека // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1982. — 10. — С.111–113.
5. Астахова В. С., Настенко Е. П., Оксамытная Е. Г. Показатели клонирования и архитектоника колоний стромальных фибробластов костного мозга человека при заболеваниях различного генеза // Биополимеры и клетка. — 1994. — №2. — С.11-16.
6. Диагностика лейкозов. Атлас и практическое руководство / Глузман Д.Ф., Абраменко И.В., Складенко Л.М., Крячок И.А., Надгорная В.А. / Под ред. Глузмана Д.Ф. — К.: «МОРИОН». — 2000. — 224 с.
7. Маланчук В.О. Реконструктивно-відновні операції на нижній щелепі (клініко-лабораторне дослідження): автореф. на здобуття ступеню докт. мед. наук: спец. 14.01.22 «Стоматологія» / В.О. Маланчук — Київ, 1994. — 50 с.
8. Маланчук В.А., Астахова В.С., Циленко О.Л. Остеогенная активность костного мозга различных донорских участков скелета человека / Стоматологический журнал — 2007 — №2. Том VIII — С.129-132
9. Маланчук В.А., Астахова В.С., Циленко О.Л. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека в реконструктивно-восстановительной хирургии // Журн. АМН України, 2009, т.15, № 2. — С.276-288
10. Хэм. А., Кормак Д. Гистология. Москва, Мир. 1983.
11. Ціленко О.Л. Ефективність лікування хворих з дефектами та деформаціями кісток лицевого черепа: автореф. на здобуття ступеню канд. мед. наук: спец. 14.01.22 «Стоматологія» / О.Л. Ціленко — Київ, 2004. — 20 с.
12. Astachova V., Malanchuk V., Tsilenko O., Carinci F. Morphological cell typing of osteoid clones derived from human bone marrow / J Maxillofac Oral Surg 8(2) — 2009 — p.114-120.
13. Burch W. M., Hammer L., Wuthier R. S. Phosphotyrosine and phosphoprotein phosphatase activity of alkaline phosphatase in mineralizing cartilage // Metabolism. — 1985. — Vol. 34, N 2. — p.169-175.
14. Burgio V. L., Magrimi U., Ciardelli L. et al. Enzyme histochemical approach to the study of the human bone marrow stroma // Acta Haematol. — 1984. — Vol. 71. — p.73-80.
15. Crisp A. J., McGuire-Goldring M. B., Goldring S. R. A system for culture of human trabecular bone and hormone response profiles of derived cells // Brit. J. Exp. Pathol. — 1984. — Vol. 65, N 6. — p.645-654.
16. Farley J. R., Baglink D. J. Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro // Metabolism. — 1986. — Vol. 35, N 6. — p.563-571.

ПО ПИСЬМАМ ЧИТАТЕЛЕЙ

Материал подготовила Катерина Иванова

1. Какие необходимые условия для использования несъемной ортодонтической техники на этапе раннего лечения?

- Возраст пациента между 7 и 9 годами (когда прорезались четыре верхние постоянные резцы и первые постоянные моляры).
- Сформированность длины корня на 2/3, достаточная длина клинической коронки.
- Здоровая эмаль зубов.
- Адекватная кооперация ребенка и его родителей.

2. Какие функции имеет программа Dolphin, кроме расшифровки ТРГ?

Программа Dolphin включает в себя два модуля: 2D и 3D. В свою очередь, модули состоят из подмодулей. Модуль 2D включает в себя подмодули ImagingPlus, CepH Tracing и Treatment Simulation. С помощью ImagingPlus Вы можете создавать обширную карточку пациента в электронном виде. CepH Tracing используется в большинстве клиник мира для быстрой и удобной расшифровки латеральной и фронтальной ТРГ. Программный модуль моделирования лечения Treatment Simulation позволяет Вам планировать и диагностировать результат лечения, а также, показывать будущий результат пациенту. Модуль 3D создан для планирования ортогнатических операций.

3. Что такое «социальная шестерка» для лингвальных брекетов?

Индивидуальная лингвальная брекет-система eBrace для выравнивания передних зубов в случаях с малой и умеренной скученностью и для закрытия промежутков.