

Рис. 2. Динаміка вмісту магнію та натрію в твердих тканинах коренів постійних зубів на різних етапах їх формування.

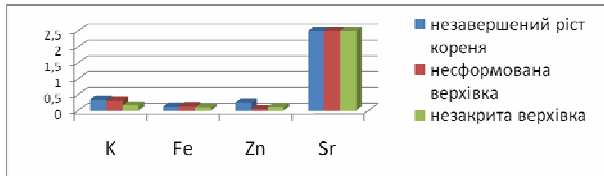


Рис. 3. Динаміка вмісту мікроелементів в твердих тканинах коренів постійних зубів на різних етапах їх формування.

Висновки і перспективи подальшого розвитку. Результати проведеної роботи дозволяють стверджувати, що всі досліджувані мінеральні елементи виявляються в об'єктах вивчення в кількостях, що є можливими для вимірювання або у вигляді слідів, і підлягають віковій динаміці, характерній для кожного елемента зокрема, пов'язаній, очевидно, з нерівномірним перебігом у коренях, що формуються, процесів структурної перебудова та мінералізації та превалюванням на різних етапах розвитку коренів одного з цих процесів. На нашу думку, подальше вивчення мінерального складу твердих тканин коренів постійних зубів та його вікової динаміки за фізіологічних умов є доцільним і необхідним, оскільки дозволить розробити заходи, скеровані на запобігання розвитку патології кореневої системи зубів, пов'язаної як з відхиленнями у процесі розвитку та росту коренів так і з відхиленнями у процесі їх мінералізації а отже і передчасній втраті зубів.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Антонішин Б.В. Хімічний склад емалі та її карієс-резистентність/Б.В.Антонішин, О.М.Наконечна// Український стоматологічний альманах. -2001.-№6.-С.5-8.
2. Безвужко Е.В. Епідеміологічні показники карієсу зубів у дітей Львівської області/ Е.В. Безвужко, Н.А. Чухрай, Н.М. Крушник // Новини стоматології. 2007. -

№1 (50). – С. 48-51.

3. Главацька В.І. Вміст свинцю у молочних зубах дітей промислового міста/ В.І.Главацька // Довкілля та здоров'я 2005.- №2- С. 54-56.

4. Демчина Г.Р. Стимуляція карієсрезистентності в критичні періоди морфогенезу твердих тканин зуба / Г.Р. Демчина, В.С. Кухта // Стоматологічні новини: зб. наукових праць. – Львів, 2001. – Вип.1. – С. 19-23.

5. Масна З.З. Динаміка хімічного складу твердих тканин постійних зубів у період формування постійного прикусу /З.З.Масна// Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2003. – 2003. – 3. – С. 46-48

6. Масна З.З. Вікова динаміка структури та мінерального складу зубних зачатків та кісткової тканини щелепи в пренатальному періоді онтогенезу/ З.З. Масна // Актуал. пробл. сучасн. мед.: Вісн. Укр. мед. стомат. акад. – 2003. – Том. 3, Випуск 2 (6). – С. 30-33.

7. Масна З.З. Особливості вікової динаміки вмісту окремих мікроелементів в твердих тканинах молочних зубів / З.З. Масна, І.І. Бобрик // Український медичний альманах. 2006. – Т. 9. №4. – С. 96-97.

8. Остапко О.І. Хімічний склад емалі та стан твердих тканин постійних зубів у дітей в різних за екологічною ситуацією регіонах України /О.І. Остапко // Новини стоматології. – 2007. - №4 (53). – С.38-42

9. Скрипников П.Н. Алгоритм изучения минерализации эмали в норме и при патологии / П.Н. Скрипников, А.В. Марченко, Е.А. Сирено // Вісник проблем біології і медицини. 2003. Вип. 2. - С. 51-53.

10. Скрипников П.Н. Особенности биоминерализации некоторых морфологических структур эмали зуба / П.Н. Скрипников // Вісник морфології. – 2002. - №2. – С. 191-193

11. Удоод О.А. Вивчення вмісту кальцію і фосфору у твердих тканинах інтактних та депульпованих зубів з різним терміном видалення пульпи/ О.А. Удоод, І.О.Трубка, А.Г. Піляєв, К.М. Хачатурова // Стоматологічні новини. – Львів, 2001. – Вип. 1. – С.97-101

12. Gierat-Kucharzewska B., Karasinski A. Influence of chosen elements on the dynamics of the cariogenic process /B. Gierat-Kucharzewska, A. Karasinski // Biol. Trace Elem. Res. – 2006. – Vol. 111(1-3). – P. 53-62.

УДК 611-018.4/.46:616-003.9:612.117:576.3

© Панченко Л.М., Калашников А.В., Зубенко А.Г., 2010

ВПЛИВ ЗБАГАЧЕНОГО ТРОМБОЦИТАМИ ФІБРИНОВОГО ГЕЛЮ НА КЛОНОГЕННУ АКТИВНІСТЬ СТОБУРОВИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ IN VITRO

Панченко Л.М., Калашников А.В., Зубенко А.Г.

ДУ «Інститут травматології та ортопедії АМН України»

Панченко Л.М., Калашников А.В., Зубенко А.Г. Вплив збагаченого тромбоцитами фібринового гелю на клоногенну активність стовбурових стромальних клітин кісткового мозку людини in vitro // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 137-139.

Виконано порівняльне культуральне дослідження впливу збагаченого тромбоцитами фібринового гелю на клоногенну активність стовбурових стромальних клітин кісткового мозку 7-ми пацієнтів. В результаті дослідження визначено позитивний вплив збагаченого тромбоцитами фібринового гелю на колонієутворення та диференціювання стовбурових стромальних клітин in vitro.

Ключові слова: стовбурові стромальні клітини кісткового мозку, збагачений тромбоцитами фібриновий гель, клонування, репаративний остеогенез.

Панченко А.М., Калашников А.В., Зубенко А.Г. Влияние обогащенного тромбоцитами фибринового геля на клоногенную активность стромальных клеток костного мозга человека *in vitro* // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 137-139.

Выполнено сравнительное культуральное исследование влияния обогащенного тромбоцитами фибринового геля на культуру стромальных клеток костного мозга 7-ми пациентов. В результате исследования определено положительное влияние обогащенного тромбоцитами фибринового геля на колониеобразование и дифференцировку стромальных клеток *in vitro*.

Ключевые слова: стромальные клетки костного мозга, обогащенный тромбоцитами фибриновый гель, клонирование, репаративный остеогенез

Panchenko L.M., Kalashnikov A.V., Zubenko A.G. Influence of platelet rich fibrin on cloning activity of stromal stem cells *in vitro* // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 137-139.

Comparative cultural research is executed of influence platelet rich fibrin on the culture of stromal stem cells of bone marrow of 7th patients. As a result of research positive influence is certain platelet rich fibrin on colony-formation and differentiation of stromal stem cells *in vitro*.

Key words: stromal stem cells of bone marrow, Platelet rich fibrin, cultural research.

В полі зору травматологів постійно знаходиться кісткова тканина, вивчаються умови репаративної регенерації. Йде також пошук причин, які призводять до уповільнення або повної відсутності зрощення кісткових уламків. Загальновідомо, що лікування майже третини хворих з переломами довгих кісток ускладнюється уповільненою консолидацією, а в деяких випадках - незрощенням перелому або хибним суглобом, навіть при застосуванні сучасних методів лікування.

Профілактика розладів репаративного остеогенезу та оптимізація умов його перебігу є актуальною проблемою для багатьох вітчизняних та зарубіжних вчених. Важливим для загоєння перелому є створення сприятливих умов для репаративної регенерації. В останні роки великого значення в реакціях репаративного остеогенезу надають застосуванню різних біоматеріалів із остеоіндуктивними або остеокондуктивними властивостями. Величезна кількість досліджень присвячена використанню аутокістки, аллокістки, керамічного гідроксиапатиту тощо для активізації регенераторних процесів. Але проблема профілактики та лікування розладів репаративного остеогенезу все ще є актуальною.

У зв'язку з цим принципово важливою є розробка технології оптимізації репаративного остеогенезу шляхом застосування остеопластичних матеріалів, яка б забезпечила відсутність токсичності останніх, бактеріальну та вірусну безпеку, повну біодеградацію, біосумісність, поєднання властивостей остеокондуктивності та остеоіндуктивності.

Найбільше відповідають цим вимогам аутологічні матеріали, використання яких прискорює диференціацію остеогенних клітин, ангиогенез у кістковому регенераті та клітинну регенерацію кісткової тканини. Це в свою чергу покращує зрощення кісткових уламків, попереджує уповільнення репаративних процесів в зоні пошкодження. Наразі багато уваги приділяється вивченню перебігу репаративної регенерації кісткової тканини на різних рівнях та стадіях, клітинній та гуморальній регуляції цих процесів, вивченню впливу цитокінів на клітинну диференціацію остеогенних клітин-попередників.

На сьогодні, в розвинутих країнах світу широко вивчається вплив аутологічного збагаченого тромбоцитами фібринового гелю на репаративні процеси в сполучній тканині. Тромбоцити – це клітини крові, які запускають процеси репаративної регенерації кісткової тканини. Під час активації тромбоцитів відбувається їх агрегація та виві-

лення ростиових факторів, котрі впливають на зростання кількості та диференціацію детермінованих та індукційних остеогенних клітин.

Історія застосування тромбоцитів у клінічній практиці не досить тривала. Методика отримання тромбоконцентрату була розроблена на початку 1970-х років. Хоч різні ростиові фактори були відкриті раніше, про експериментальне використання активованої тромбоцитарної маси були лише поодинокі повідомлення до середини 1990-х років [5]. Withman D. на з'їзді щелепно-лицьових хірургів у 1997 році оприлюднив дані про те, що після активації тромбоцитів та перетворення їх концентрату в гель відбувається виділення ростиових факторів, які сприяють прискоренню загоєння ран [6].

У вітчизняній літературі не знайдено джерел, де приділяється увага розробці та впровадженню застосування збагаченого тромбоцитами фібринового гелю. В іноземній літературі знайдено незначну кількість робіт, в яких вивчався вплив збагаченої тромбоцитами плазми на зрощення кісток як при клінічному застосуванні у хворих, так і в експерименті, а також вплив тромбоцитарної маси на остеогенні клітини *in vivo* [4].

Попередніми дослідженнями також встановлено, що репаративна регенерація кісткової тканини, а саме – зрощення перелому кістки відбувається за рахунок стовбурових стромальних клітин (ССК) кісткового мозку – остеогенних клітин-попередників, які шляхом диференціації перетворюються в остеобласти та остецити [3].

Найбільш зручною моделлю, наближеною до умов «*in vivo*» є методика клонування остеогенних клітин-попередників кісткового мозку людини з додаванням аутологічного тромбоконцентрату, яка дозволяє досконало вивчати взаємодію матеріалів та клітин кісткового мозку «*in vitro*» з унаочненням впливу різних біологічно активних речовин на проліферацію та диференціювання стовбурових стромальних клітин.

Мета нашої роботи полягала в експериментальному імунологічно-культуральному обґрунтуванні можливості використання збагаченого тромбоцитами фібринового гелю для оптимізації репаративної регенерації кісток за його впливом на стовбурові стромальні клітини кісткового мозку *in vitro*.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили в умовах *in vitro*. Всього у дослідженні взяли участь 7 пацієнтів віком від 32 до 60 років. Венозну кров для виготовлення багатой на тромбоцити плазми та зразки спонгіозної аутокістки

забирали у кожного пацієнта інтраопераційно.

Методика отримання збагаченого тромбоцитами фібринового гелю включає застосування компактною лабораторної центрифуги та стандартної системи забору крові. Об'єм кожної пробірки 9 мл. Кров збирається із ліктьової вени пацієнта у пробірку та центрифугується протягом 12 хв. зі швидкістю 2600 об/хв. Кінцевим продуктом є тромбоцитарно- фібриновий гель. До переваг цієї методики відносять однократну обробку крові в центрифугі, невелику кількість крові та достатньо просту схему отримання гелю.

Клонування стовбурових стромальних клітин кісткового мозку проводили за методикою О.Я. Фриденштейна (1973) [2] у модифікації В.С. Астахової (1982) [1].

Методика дослідження полягала в наступному. Тромбоцитарно-фібриновий гель додавали у культуральну систему безпосередньо при внесенні клітин кісткового мозку в чашки Петрі (по 0,2мл на чашку діаметром 10 см). Культури вирощували без зміни поживного середовища протягом 14 діб. Саме за цих умов *in vitro* в нормі стовбурові стромальні клітини проходять весь цикл диференціювання - від раних попередників до зрілих форм, для яких характерна здатність до синтезу основної речовини кісткової тканини з наступною її мінералізацією. Всього досліджено 21 зразок спонгіозної кістки. Вирощено 40 культур стромальних фібробластів. Кожному досліду відповідав контроль - культивування стовбурових стромальних клітин кісткового мозку за стандартних умов без додавання тромбоцитарного фібринового гелю. Результати оцінювали за показником ефективності клонування - числом ССК серед 10^5 ядромісних клітин кісткового мозку.

Результати та їх обговорення. Як показали проведені дослідження, зареєстрований ріст стромальних фібробластів кісткового мозку в культурах з додаванням тромбоцитарно-фібринового гелю вже свідчить про відсутність його гальмівного впливу на проліферацію стовбурових стромальних клітин *in vitro*. Оцінку отриманих даних проводили окремо по кожному досліді, зважаючи на значні індивідуальні коливання остеогенної активності кісткової тканини пацієнтів.

Середні величини кількості утворених колоній та клонування остеогенних клітин- попередників кісткового мозку в присутності тромбоцитарно-фібринового гелю та без нього по кожному досліді наводимо в таблиці.

Таблиця. Результати клонування ССК кісткового мозку з додаванням збагаченого тромбоцитами фібринового гелю

№ досліду	Кількість утворених колоній, абс.		Ефективність клонування ССК серед 10^5 ядромісних клітин	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
1	4	23	4,0	23,0
2	8	47	16,0	94,0
3	7	0	14,0	0
4	4	21	3,64	23,33
5	45	0	37,5	0
6	0	1	0	0,15
7	1	8	0,14	1,12

Як видно з таблиці, і в дослідних і в контрольних культурах зареєстровані суттєві коливання як кількості утворених колоній, так і ефективності клонування ССК кісткового мозку серед 10^5 ядромісних клітин. Але, якщо за кількостями колоній що виросли у чашках Петрі у досліді та контролі розбіжності не такі наочні, то за величинами ефективності клонування є значні відмінності - у контрольних культурах цей показник знаходиться у межах від 0 до 37,5 і в середньому становить $10,75 \pm 5,07$, а у дослідних - у межах від 0 до 94,0 і складає $20,23 \pm 12,25$. Ця різниця хоч і статистично недостовірна, але складає 1,8 рази, тобто у присутності тромбоцитарно-фібринового гелю більш, ніж на 80 відсотків зростають проліферативна активність та диференціювання ССК кісткового мозку пацієнтів. Слід зауважити також, що в третині дослідних культур під впливом тромбокоцентрації збільшувалась кількість багатопарових колоній. На нашу думку це може свідчити про позитивну тенденцію стимуляції в даних умовах структуро-утворювального потенціалу стовбурових клітин-попередників кісткового мозку пацієнтів.

Висновки:

1. Результати досліджень свідчать про позитивний вплив збагаченого тромбоцитами фібринового гелю на показники клоногенної активності стовбурових стромальних клітин кісткового мозку людини *in vitro*.
2. Експериментально доведена можливість ефективного використання тромбоцитарно-фібринового гелю для оптимізації репаративної регенерації кісток.
3. Приведені показники вказують на доцільність застосування збагаченого тромбоцитами фібринового гелю в лікуванні хворих з переломами довгих кісток для профілактики розладів репаративного остеогенезу.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Астахова В.С. Остеогенные клетки- предшественники костного мозга человека. - К.:Фенікс, 2000. - 176с.
2. Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. - М.:Медицина, 1973. - 223с.
3. Фриденштейн А.Я., Петракова К.В., Куралесова А.Н и соавт. Клетки-предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротопных трансплантатов костного мозга //Цитология. - 1968. - №5-С.557 - 567.
4. Dallari D., Savarino L., Stagni C., Cenni E., Cenacchi A., Fornasari P.M., Albinini U., Rimondi E., Baldini N., Giunti A. Enhanced Tibial Osteotomy Healing with Use of Bone Grafts Supplemented with Platelet Gel or Platelet Gel and Bone Marrow Stromal Cells. //The Journal of Bone and Joint Surgery [American]. - 2007 - № 89 - P. 2413 - 2420.
5. Graves D.T., Owen A.J., Antoniadis H.N. Evidence that a human osteosarcoma cell line which secretes a mitogen similar to platelet-derived growth factor requires growth factor present in platelet-poor plasma. // Cancer Res. - 1983 - №43 - P.83 - 7.
6. Withman D.H., Berry R.L., Green D.M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. // J. Oral Maxillofac. Surg. - 1997 - № 55 - № 1294 - 1299.