

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ РОЗДІЛ

УДК 616.716.8-006.3-089:612.119

А.П. Брашкін

УМОВИ КЛІТИННОГО ТРАНСПОРТУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПРИ ОСТЕОПЛАСТИЦІ

Донецький національний медичний університет ім. Максима Горького

Відтворення кісткової тканини альвеолярного відростка - одна з важливих і складних проблем у лікуванні хворих на генералізований пародонтит [1].

В арсеналі сучасних стоматологів є низка новітніх технологій та біоматеріалів для вирішення цих завдань, одним із яких став метод відновлення кісткових дефектів із використанням клітинних і тканинних технологій [2]. Відомо, що успіх клітинної трансплантації при відновленні дефектів кісткової тканини залежить від кількості клітин, які переносять, умов кісткової рани, ступеня адгезії та життєздатності клітинного пулу в композиції і в умовах рани. Відтворення оптимальних умов потребує уважного і зваженого підходу до вибору остеопластичного матеріалу, який використовують у ролі носія остеопрогеніторних клітин.

Наявність великої кількості матеріалів, які пропонують сучасні виробники, свідчить про нерозв'язаність цієї проблеми, тому одним із важливих питань клітинно-тканинних технологій є вибір носія, на якому клітини мають доставлятися в реципієнтне ложе [3].

Мета дослідження - вивчити властивості кістковопластичного матеріалу, який має відповідати вимогам оптимального носія мезенхімальних стовбурових клітин при відновленні кісткової тканини, в тому числі щелепної кістки.

Матеріали і методи

Для вивчення питання спільно з Лабораторією клітинного і тканинного культивування ІНВХ ім. Г.К.Гусака проведено дослідження, в ході якого культура фетальних фібробластів (ФФ) шурів культивувалася на різних остеопластичних матеріалах.

В експерименті використовували відповідні матеріали. «Bas-Ha» - синтетична кераміка на основі фосфату кальцію, що не резорбується, гранули розміром 0,3 мм. «Hypro-Sorb F» - аттель-колагенова мембрана, що розсмоктується (двошарова), вироблена з немережевого біополімеру.

Дизайн мембрани виконаний таким чином, що одна сторона (гладка) повинна мати напрямок до окістя, а шорстка - до майбутньої кістки. «Колапан-Л» - препарат для відновлення кісткової тканини, профілактики і лікування гнійних ускладнень, що складається зі штучного гідроксилапатиту, колагену і лінкоміцину [4, 5, 6, 7].

Для проведення експерименту використовували клітинну культуру фібробластів, отриману з одного 7-денного ембріона.

Стандартизовану концентрацію клітин (концентрація клітин у суспензії - 1,5 млн. у 1 мл) об'ємом 5 мл вносили в культуральний посуд зі стандартизованою кількістю остеотропного матеріалу. Культивування на матеріалах проводили в стандартних умовах при температурі 37°C і 5% CO₂ протягом 7-х діб.

Перед підсадкою клітин остеотропний матеріал готували для реципієнції. Для цього матеріал «Bas-Ha» (гідроксилапатит), «Hypro-Sorb F» (двошарова колагенова мембрана) і «Колапан-Л» (колаген із гідроксилапатитом) змочували в 0,9% розчині NaCl. Культуру ФФ на «Hypro-Sorb F» підсаджували як на гладку, так і на шорстку поверхню. «Вітал» (β-3-кальцій фосфат) замішували з рідиною за інструкцією щодо використання.

Для об'єктивізації дослідження в кожній досліджуваній групі проводили по 5 дослідних посівів, так само культивування у 2-х контрольних пробірках (без внесення остеотропного матеріалу).

Сумісність культури з остеотропними матеріалами вивчали за наявності або відсутності фібробластів після експозиції культури на матеріалі, наявності проліферації клітин, кількістю і формою фібробластів. Для цього перед культивуванням проводили вітальне забарвлення культури фібробластів. Забарвлення клітинної культури вітальними барвниками «РКН 67 Green», «РКН 26 Red» проводили за інструкцією фірми-виробника «Sigma-Aldrich, Inc.», США.

Кількісну оцінку проводили візуально, з використанням флуоресценції на мікроскопах LEICA

DM IL і LEICA DM LS при збільшенні $\times 100$ шляхом підрахунку світіння забарвлених клітин у полі зору при стандартизованих параметрах відеозахвату зображення за допомогою програмного забезпечення робочої станції LEICA 500/550 / Win. Підрахунок виконували в 10 полях зору по діагоналі об'єктива з визначенням середніх показників.

Результати дослідження та їх обговорення

Мікроскопія досліджуваних матеріалів на 7-у добу показана в табл. 1.

У I досліджуваній композиції («Bas-NA» + культура ФФ) флюоресценції клітин, відповідно і їх проліферації не виявлялося, тобто експозиція культури з «Bas-NA» показала відсутність адгезії і проліферації клітин ФФ щурів на цьому матеріалі.

Результати колонізації II композиції («Вітал» + культура ФФ) показали, що матеріал за наявності живильного середовища розпадався на мікрогранули, культура фібробластів підлягала апоптозу через відсутність адгезії.

Мікроскопія III композиту («Колапан-Л» + культура ФФ) показала наявність світіння, характерного для одиночних вітально забарвлених клітин, середній показник яких склав 29 клітин у 1-му полі зору (кл. / п.з.). Ознак колонізації клітин практично не було - 1-2 колонії в 1-му полі зору (кл. / п.з.), фібробласти були округлої форми. Таким чином, культивування клітин на цьому матеріалі дозволяє говорити про адгезію клітин на матеріалі, але незначну проліферацію і диференціацію їх.

Таблиця 1
Результати культивування культури ФФ на остеотропних матеріалах

№ групи	Остеотропний матеріал	Середня кількість клітин, $M \pm m$, кл. / п.з.	Середня кількість колоній, $M \pm m$, кол. / п.з.	Форма клітин
1	«Bas-NA»	-	-	-
2	β -3-кальцій-фосфат	$2,5 \pm 1,4$	-	округлі
3	«Колапан-Л»	$29 \pm 5,2$	$1,5 \pm 0,5$	округлі
4	«Hypro-Sorb F» (гладка поверхня)	$57,1 \pm 17,2$	$2,4 \pm 1,3$	округлі
5	«Hypro-Sorb F» (шорстка поверхня)	$76,3 \pm 38,8$	$10,6 \pm 8,5$	довгасті
6	Контроль			

Культивування в IV групі («Hypro-Sorb F» + культура ФФ на гладкій поверхні) показала рясне світіння фібробластів - 57 (кл. / п.з.) Клітини розташовувалися поодинокі і мали округлу форму, помітна велика кількість колоній клітин ФФ, 2-3 кол. / п.з. Таким чином, культивування на гладкій поверхні двошарової мембрани «Hypro-Sorb F» показало, що адгезія фібробластів на мембрані можлива, є окремі випадки колонізації клітин, їх подальша диференціація відсутня.

Культивування в V композиції («Hypro-Sorb F» + культура ФФ на шорсткій поверхні) показала множинне світіння фібробластів - 76 кл. / п.з. (у деяких полях зору кількість клітин перевищувала 100 кл. / п.з.). Клітини ФФ розташовувалися переважно групами - 11 кол. / п.з., у великій кількості; мали довгасту форму, близьку до зрілого фібробласта. Таким чином, культивування на шорсткій поверхні мембрани «Hypro-Sorb F» показало, що у фібробластів виникає міцна адгезія на цьому матеріалі, що сприяє їх проліферації та диференціюванню.

Культивування в VI (контрольній) групі показало множинне зростання в культуральній посуді. Культура фібробластів утворювала моношар. Їхня форма відповідала первинній формі ФФ.

Отже, вибір носія, на якому клітини мають доставлятися в реципієнтне ложе, є одним із важливих питань клітинно-тканинних технологій, яке суттєво впливає на результати лікування. При цьому носій служить тимчасовим екстрацелюлярним матриксом, із яким взаємодіють клітини до

формування нової кісткової тканини. В умовах *in vitro* клітини найчастіше культивуються на плоскій поверхні, однак необхідність тримірного тканиноподібного росту зумовлюється структурною природою скелета, що звужує вибір матеріалу.

Серед матеріалів, які беруть участь в утворенні матриксу, відомі полімери - альбумін, фібрин чи фібриноген, колаген, синтетичні поліамінокислоти і поліаміни, полісахариди (альгінат, гепарин). Синтетичні полімери, які можуть бути використані для формування матриксу, включають біодеградуючі полімери - полі-L-молочну кислоту, полігліколієву кислоту, полілактид-ко-гліколід та ін. [8, 9, 10]. Серед полімерів найбільшого визнання заслужив колаген, тривимірна структура якого сприяє прикріпленню клітин, а також зв'язуванню факторів росту [11]. У дослідженні *in vitro* остеогенного потенціалу різних субстратів продемонстровано, що колаген I типу найкраще сприяє остеогенній диференціації МСК [12, 13].

Висновки

Отже, з'ясовано суттєве значення остеопластичного матеріалу, що використовується в ролі носія мезенхімальних стовбурових клітин у вирішенні питань регенерації кісткової тканини. Для забезпечення адгезії, проліферації та подальшої диференціації клітинних ліній необхідно використовувати носії, які б окрім неорганічних сполук (апатиту) містили ще й органічні речовини (наприклад, колаген).

Литература

1. Астахова В. С. Определение регенераторного потенциала костной ткани пародонта / В. С. Астахова, Л. М. Панченко, О. Н. Романенко // Вісник стоматології. – Одеса, 2001. – № 4. – С. 75.
2. Применение костнопластического материала как носителя аутологичных стволовых клеток кролика для замещения костного дефекта челюсти / [Куцевляк В.И., Куцевляк В.Ф., Микулинский Ю.Е., Щегельская Е.А.] // Стоматологічна імплантологія. Остеоінтеграція: матеріали другого Україн. міжнар. конгр.- К., 2006.- С. 72-84.
3. Угрін М. М. Огляд кістково-пластичних матеріалів в Україні / М. М. Угрін // Імплантологія. Пародонтологія. Остеологія. – Львів, 2007. – № 1. – С. 11-15.
4. Опыт применения биокпозиционных остеопластических материалов / С. Ю. Иванов, А. Ф. Панасюк, А. М. Панин [и др.] // Нижегородский медицинский журнал. – 2003. – № 2. – С. 244-250.
5. Hypro-Sorb® F - резорбтивная двухслойная мембрана для направленной тканевой и костной регенерации [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.hypro.cz/DOWNLOAD/Hypro-Sorb_F_RU_cat.
6. A new benchmark for bone repair in periodontal defects & implantology [Electronic resource]. – Access mode: http://biocomposites.com/dental/fortoss_vital.asp.
7. Bone regeneration using beta-tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix / L. Podaropoulos, A. A. Veis, S. Papadimitriou [et al.] // J. Oral Implantol. – 2009. – Vol. 35, № 1. – P. 28-36.
8. Evaluation of the effects of different biomaterials on bone defects / M. Dalkyz, A. Ozcan, N. Yapar [et al.] // Implant. Dent. – 2000. – Vol. 9, N 3. – P. 226-235.
9. Bone tissue engineering seeded with bone marrow stromal cells / Z. Guo, G. Dang, Z. Wang [et al.] // Article in Chinese. – 1999. – Vol. 37, N 7. – P. 395-398.
10. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model / E. Yoon, S. Dhar, D. E. Chun [et al.] // Tissue Eng. – 2007. - 13(3). - P. 619-627.
11. Eid K. Systemic effects of severe trauma on the function and apoptosis of human skeletal cells / K. Eid, L. Labler, W. Ertel // J. Bone Jt. Surg. – 2006. – Vol. 88-B, № 10. – P. 1394-1400.
12. Rowlands A. S. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation / A. S. Rowlands, P. A. George, J. J. Cooper-White // Am. J. Physiol. – 2008. - № 295. – P. C1037-C1044.
13. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells / J. A. Conejero, J. A. Lee, B. M. Parrett [et al.] // Plast Reconstr Surg. - 2006 -117(3). - P. 857-63.

**Стаття надійшла
31.03.2014 р.**

Резюме

Наведені результати вивчення властивостей остеопластичного матеріалу, що відповідає оптимальним умовам носія мезенхімальних стовбурових клітин при регенерації кісткової тканини. У дослідженні протестовані кілька матеріалів шляхом підсадки на них фетальних фібробластів щурів із подальшим культивуванням. Якості матеріалів вивчали шляхом візуальної оцінки росту і диференціювання клітинної культури. З'ясували, що не всі остеопластичні матеріали відповідали оптимальним вимогам. Оптимальні умови перенесення клітин у кісткову рану припускають наявність у носії колагену.

Ключові слова: регенерація кісткової тканини, трансплантація, остеопластичні матеріали, мезенхімальні стовбурові клітини.

Резюме

Приведены результаты изучения особенностей остеопластического материала, отвечающего оптимальным условиям носителя мезенхимальных стволовых клеток при регенерации костной ткани. В исследовании протестированы несколько материалов путём подсадки на них фетальных фибробластов крыс и с последующим культивированием. Качества материалов изучали путём визуальной оценки роста и дифференцировки клеточной культуры. Выяснили, что не все остеопластические материалы отвечали необходимым требованиям. Оптимальные условия переноса клеток в костную рану предполагают наличие в носителе коллагена.

Ключевые слова: регенерация костной ткани, трансплантация, остеопластические материалы, мезенхимальные стволовые клетки.

Summary

In this study, the features of osteoplastic material corresponding to the optimum conditions carrier mesenchymal stem cells in bone tissue regeneration are described. In the research work several materials are tested by replanting them fetal rat fibroblasts and subsequent cultivation. The quality of materials was studied by visual assessment of growth and differentiation of the cell culture. It was found that not all osteoplastic materials met optimum requirements. Optimal conditions of transfer of cells into bone wound need collagen in carrier.

Key words: bone regeneration, transplantation, osteoplastic materials, mesenchymal stem cells.