

© Браун Ю. Є.

УДК: 616.314.13-085:611-081.41:612.08

Браун Ю. Є.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРЯМОГО ВПЛИВУ ЕМАЛЕВИХ МАТРИЧНИХ ПРОТЕЇНІВ НА ОСТЕОГЕННІ КЛІТИНИ-ПОПЕРЕДНИКИ КІСТКОВОГО МОЗКУ IN VITRO

Національна медична академія післядипломної освіти

імені П. Л. Шупика (м. Київ)

julia8braun@gmail.com

Робота є фрагментом НДР ІС НМАПО ім. П.Л. Шупика та є складовою частиною загальної теми науково-дослідної роботи кафедри терапевтичної стоматології НМАПО ім. П. Л. Шупика «Патогенетичне обґрунтування нових підходів профілактики та лікування генералізованих захворювань тканин пародонта та супутньої їм патології твердих тканин зубів», номер державної реєстрації 01111U002802.

Вступ. Генералізований пародонтит (ГП) є найбільш поширеною патологією серед хвороб тканин пародонта [3-5,12,15,16], залишаючись і до сьогоднішнього дня неповністю вилікованою. Важливою особливістю цього захворювання є хронічний перебіг, який супроводжується прогресуючим руйнуванням та втратою періодонтальних тканин [3,4,16]. При цьому вражається альвеолярна кістка, періодонтальна зв'язка та цемент кореня зуба, які за даними сучасних досліджень [5,13-16] характеризуються дуже повільним відновленням та регенерація яких залежить від загосення інших компонентів періодонтального комплексу тканин [3,12,13]. Складність будови періодонтальних тканин та їх анатомічний зв'язок в ході функціонування, обумовлюють складність досягнення бажаної регенерації за допомогою існуючих сучасних методів [3,4,10,11,13,14]. Втрата зуба або груп зубів у хворих на ГП, залишається частим наслідком несвоєчасного лікування та результатом прогресування ГП [5,15,16]. Але досягненнями останніх десятиліть було показано, що пародонтальна регенерація може бути досягнута [13,14]. Завдяки створенню умов для клітин та їх мікрооточення, які нагадують протікання процесу формування пародонтальної зв'язки, стало можливим досягнення регенерації пародонта. Під дією емалевих матричних протеїнів (ЕМП), в тому числі препарата Emdogain [12,16]. Роботами чисельних авторів показано, що різні типи клітин, в тому числі і стромальні клітини-попередники кісткового мозку, мо-

жуть приймати участь у регенерації пародонта [6-8,10-14]. Різні види клітин пародонтальної рани мають здатність до трансформації в певні типи, які відповідають за ремоделювання та відновлення архітектури пародонтальних тканин [3,4,12-14,16]. ЕМП мають здатність хімічного впливу на різні типи клітин [11,13,14], а також завдяки преципітації на кореневу поверхню кореня, вони створюють мікрооточення для цементобластів, остеобластів та їх попередників [13,14,16]. Однак до тепер є незрозумілим, який з типів ЕМП індукує регенерацію та які саме молекулярні механізми задіяні в цьому процесі [9-11,13,14,16]. Під час дослідження прямої дії ЕМП на людські остеобласти лінії SaM-1 від одного пацієнта (Keila S. et al., 2004) на строму кісткового мозку стегнової кістки щура (Mizutani S. et al., 2003) та преостеобластичну лінію клітин мишей в експерименті (He J. et al., 2004), була визначена значна стимуляція на проліферацію клітин. Однак Rickon J.C. et al. (2005) в своєму дослідженні при використанні клітин альвеолярного паростка, не спостерігали ефекту від прямої дії ЕМП на процеси проліферації. Проте використання ЕМП при хірургічних втручаннях на пародонті за даними Sculean A. et al. (2014) призводить до регенерації кісткової тканини та сприяє кращому загосенню з відновленням м'яких тканин. Наявність суперечливих даних щодо особливостей впливу Emdogain на остеогенні прогеніторні клітини, стало підставою для проведення даного дослідження.

Мета дослідження. Дослідити остеоіндуктивні властивості прямого впливу Emdogain шляхом впливу на остеогенні клітини – попередники кісткового мозку людини – колонієутворюючі одиниці фібробластів (КУОФ) ex vivo.

Об'єкт і методи дослідження. Проведені наукові дослідження відповідають морально-етичним принципам Гельсінської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації

(1964-2000 рр.), Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (1997 р.), відповідним положенням ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983 р.) та законам України.

Клонування КУОф кісткового мозку проводили згідно методики Фріденштейна О. Я. (1973) [5] в модифікації Астахової В. С. (1982) [1]. Для дослідження використовували здувину спонгіозну кістку, яку брали у соматично здорових пацієнтів поза межами вогнищ запалення та дегенеративно-дистрофічних уражень при проведенні ортопедичних хірургічних втручань. Забір кісткового матеріалу у всіх пацієнтів проводили після отримання добровільної згоди в ході проведення оперативного втручання по ортопедичним показанням. Забір матеріалу мав задовольняти вимоги лабораторії та мав мати об'єм не менше 0,1 см³. Процедура забору кісткового матеріалу не спричинювала додаткової травми у пацієнтів, проводився в умовах операційної згідно загальноприйнятої методики. Забраний матеріал поміщали в контейнер з поживним середовищем "199". Клонування ССК проводили за стандартних умов протягом 14 діб без зміни культурального середовища у флаконах Ру при температурі 37°C у газовій суміші з 5% вмістом СО₂ в атмосферному повітрі з використанням летально опромінених клітин кісткового мозку кроля у якості фідера. Щільність експлантації фідерних клітин складала 5·10⁵ на 1 см² дна культурального флакона. За цих умов *in vitro* в нормі ССК проходять весь цикл диференціювання – від ранніх попередників до зрілих форм, для яких характерна здатність до синтезу основної речовини кісткової тканини з наступною її мінералізацією.

По закінченні терміну клонування (14 діб), культури фіксували етанолом 96° та фарбували за Романовським – Гімзою. За колонію приймали скупчення 50 і більше стромальних фібробластів кісткового мозку. При наявності меншої за 50 кількості клітин стромальних фібробластів, скупчення клітин приймали за кластер. Результати оцінювали за показником ефективності клонування – числом ССК серед 10⁵ ядровмісних клітин кісткового мозку.

Для дослідження прямого впливу Emdogain на клонування КУОф кісткового мозку людини було проведено 4 серії експериментів *ex vivo*. I серія – в культуральний флакон протягом посадки матеріалу до клітин кісткового мозку додавали Pref-Gel. II серія – в культуральний флакон протягом посадки клітин кісткового мозку додавали Pref-Gel і Emdogain. III серія – в культуральний флакон додавали лише Emdogain. IV серія – клонування КУОф проводили без додавання будь-яких зазначених препаратів, контрольна серія (табл. 1). В умовах проведених серій експериментів було вирощено 9 експериментальних та 6 контрольних колоній.

Регенераторний потенціал кісткової тканини оцінювали згідно значення показника ефективності клонування КУОф кісткового мозку людини серед 10⁵ ядровмісних клітин (ЕККУОф). Показник ефективності клонування КУОф оцінювали згідно формули:

$$ЕККУОф = \frac{K}{N} \times 105$$

де K – кількість колоній, які виростили в культуральному флаконі на 10⁵ ступені; N – кількість клітин, які були посаджені в культуральний флакон.

Статистичний аналіз проводили в програмі «Statistica».

Результати досліджень та їх обговорення. При проведенні клонування КУОф кісткового мозку людини бактеріальний чи грибовий проріст не спостерігали в жодній серії експериментів. Це означає, що проведений експеримент проведено згідно вимог використаної методики та з дотриманням умов стерильності на всіх етапах при роботі з вітальними кістковомозковими клітинами – КУОф та компонентами експерименту – ін'єкційна форма 24% ЕДТА та Emdogain. Результати дослідження наведені в таблиці 2.

У 1-й та 2-й групах серії експерименту в 6 випадках (66,7%) при додаванні травильного гелю Pref-Gel та комбінації Pref-Gel з Emdogain ріст стромальних фібробластів не спостерігався, ефективність клонування – ЕККУОф = 0. В культуральних флаконах зустрічались лише поодинокі стромальні фібробласти, які не утворювали колонії. Такі результати свідчать про прямий цитотоксичний вплив 24% ЕДТА (Pref-Gel) на ССК, які гинули під його прямою дією. Після додавання вказаного мінімального об'єму ЕДТА (0,2 мл) в культуральний флакон, спостерігалась миттєва зміна кольору поживного середовища "199". Це в свою чергу свідчить про різку зміну рН середовища у флаконі, так як по хімічній структурі ЕДТА є кислотною сполукою. Після отриманих змін, протягом всього часу експерименту колір поживного середовища у флаконі не змінювався. Такі зміни спричинювали миттєву загибель КУОф та унеможливлювали хімічну деактивацію ЕДТА, що потребує створення умов аналогічних живому організму. Це доводить прямий пошкоджуючий вплив 24% ЕДТА на вітальні ССК. У 2-й серії експерименту отримали аналогічні результати. Навіть в групах при додаванні Pref-gel і Emdogain не спостерігали покращення показників. Після додавання в культуральний

Таблиця 1.

Характеристика основних експериментальних груп

Основні експериментальні групи	Компоненти експерименту в експериментальних групах		Тривалість експерименту, умови	
I		+	0,2 мл 24% ЕДТА	Клонування 14 діб без зміни поживного середовища при температурі 37°C у газовій суміші з 5% вмістом СО ₂ в атмосферному повітрі
II	Культуральний флакон з вітальними ССК	+	0,2 мл 24% ЕДТА + 0,15 мл Emdogain	
III		+	0,15 мл Emdogain	
IV		+	Без додавання будь-яких препаратів	

Результати клонування КУОф в основних групах серії експерименту

Основні групи серії експерименту	Кількість посажених клітин у флакон	Кількість клітин фідера	Кількість колоній, що вирости	Ефективність клонування
I	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	0	0
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	0	0
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	0	0
II	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	0	0
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	0	0
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	0	0
III	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	127	13,23
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	151	15,73
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	157	16,35
IV	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	117	12,19
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	108	11,25
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	152	15,83
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	136	14,17
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	62	7,19
	9,6x10 ⁵	2x10 ⁷	137	14,27

флакон 24% ЕДТА (0,2 мл), спостерігалась аналогічна зміна кольору поживного середовища та після послідовного внесення 0,15 мл Emdogain, колір поживного середовища у культуральному флаконі залишався незмінним. За даними виробника рН Emdogain є лужним, з утриманням даного препарату в пародонтальній рані протягом 3 тижнів, що може спричинювати вплив на підтримку рН середовища за рахунок своїх хімічних властивостей [16]. Але через 14 днів отримали результати аналогічні з 1-ю експериментальною групою. Це свідчить про те, що першочергове внесення 24% ЕДТА в культуральний флакон, що імітує етапність внесення препаратів згідно рекомендацій виробника при роботі на пародонті, чинить прямий пошкоджуючий вплив на КУОф. Подальше внесення Emdogain не спричиняло зміни кольору поживного середовища. Через 14 днів не отримали ріст колоній в жодному випадку, що також свідчило про загибель вітальних клітин під дією ЕДТА.

В 3-й групі експеримента ріст КУОф спостерігався в усіх культуральних флаконах (33,3%) з додаванням Emdogain та кількість нових колоній коливалась від 127 до 157, ЕККУОф складала 13,23-16,35. В середньому з цієї серії вирости 145 колоній КУОф з ЕККУОф $15,10 \pm 0,95$ серед 10^5 ядромішуючих клітин. Додавання Emdogain в культуральний флакон спричиняло підсилення росту вітальних КУОф протягом 14 днів. Щільність колоній ad oculus не відрізнялась від аналогічних колоній без додавання препаратів (4 експериментальна група), але кількість колоній була збільшеною. Такі дані свідчать про прямий вплив Emdogain активність КУОф, спричинюючи збільшення числа колоній, а отже його остеοіндуктивні властивості.

В IV групі (контрольній) ріст КУОф спостерігався у всіх культуральних флаконах і кількість колоній складала від 69 до 152 з ЕККУОф від 7,19 до 15,83. В середньому в цій серії вирости 120 колоній КУОф

з ЕККУОф $12,48 \pm 1,24$ серед 10^5 ядромішуючих клітин. Отримані результати свідчать про те, що за умов клонування КУОф без додавання будь-яких препаратів, ріст колоній КУОф відбувався, але кількість утворених колоній була меншою порівняно з кількістю колоній КУОф отриманими під дією Emdogain (III група).

При порівнянні ad oculus колонії трьох груп (I, II, III) та контрольної (IV) не відрізнялись одна від одної.

Висновки

В 1-й та 2-й експериментальних групах ріст стромальних фіброblastів не спостерігався, ЕККУОф=0. В 3-й групі в середньому виростило 145 колоній КУОф, з ЕККУОф $15,10 \pm 0,95$ серед 10^5 ядромішуючих клітин. В контрольній групі в середньому виростило 120 колоній КУОф, з ЕККУОф $12,48 \pm 1,24$ серед 10^5 ядромішуючих клітин. Ad oculus колонії контрольної (I група) та основних груп (I-III групи) не відрізнялись одна від одної. Emdogain на 20,8% в порівнянні з контрольною групою підвищує кількість КУОф у кістковому мозку, підвищуючи специфічну щільність багатшарових колоній, вказуючи на наявність в нього остеοіндуктивних властивостей.

Попередні результати проведеного ex vivo дослідження показали наявність прямої дії Emdogain з додатковими складовими на остеοгенні клітини-попередники кісткового мозку здухвинної кістки людини ex vivo, про що свідчить підвищення активності КУОф на 20,8% у порівнянні з контролем. Підвищення специфічної щільності багатшарових колоній під впливом Emdogain вказує на наявність у нього остеοіндуктивних властивостей. Отримані результати мають значення при проведенні регенеративних хірургічних втручань на пародонті.

Перспективи подальших досліджень

Отримані результати можуть відігравати важливе клінічне значення при проведенні різних типів хірургічних втручань на пародонті, направлених на регенерацію пародонта. Це в свою чергу свідчить про необхідність розробки та включення в хід пародонтальної операції, етапу додаткової обробки пародонтальної рани (корінь зуба, альвеолярна кістка) після внесення ЕДТА, з повним її видаленням за допомогою додаткової обробки за допомогою сучасних ультразвукових приладів після струменевого промивання. Після максимально щадного внесення, необхідним є попередження контакту з суміжними вітальними тканинами, особливо кістковою тканиною. Виявлений стимулюючий ефект, отриманий після внесення ЕМП (Emdogain), свідчить про позитивну реакцію зі сторони мітотичної активності вітальних кістковомозкових клітин. Отримані результати мають значення для подальшої розробки та модифікації існуючих оперативних методів хірургічних втручань на пародонті з урахуванням особливостей клітинних взаємовідносин в пародонтальній рані.

Література

1. Астахова В. С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека / В. С. Астахова. – К., 2000. – 172 с.
2. Astachova V. S. Comparative characteristics of ksenofiders during cloning of human bone marrow stromal fibroblasts / V. S. Astachova // Bulletin of experiment, biology and medicine. – 1982. – № 17. – P. 11-113.
3. Bosshardt D. D. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels / D. D. Bosshardt // J Clin Periodontol. – 2008; 35 (Suppl. 8): P. 87-105.
4. Bosshardt D. D. Hertwig's root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth / D. D. Bosshardt, A. Nanci // Journal of Clinical Periodontology. – 2004. – № 31. – P. 184-192.
5. Cortellini P. Clinical and radiographic outcomes of the modified minimally invasive surgical technique with and without regenerative materials: a randomized-controlled trial intrabony defects / P. Cortellini, M. S. Tonetti // J Clin Periodontol. – 2011. – № 38. – P. 365-373.
6. Dacy J. A. Effects of phosphated titanium and enamel matrix derivatives on osteoblast behavior in vitro / J. A. Dacy, R. Spears [et al.] // International Journal of Oral and Maxillofacial Implants. – 2007. – № 22. – P. 701-709.
7. Deutsch D. Amelogenin, a major structural protein in mineralizing enamel, is also expressed in soft tissues: brain and cells of the hematopoietic system / D. Deutsch, A. Haze-Fildelman, A. Blumefeld [et al.] // Eur J Oral Sci. – 2006. – № 114. – P. 183-189.
8. Fong C. D. Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars / C. D. Fong, L. Hammastrum // Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endodon. – 2000. – № 90. – P. 218-223.
9. Fridenstein A. J. Induction of bone tissue and osteogenous progenitor cells / A. J. Fridenstein, K. S. Lalikina. – Moscow, "Medicine". – 1973. – 223 p.
10. Galli C. Osteopretgerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand modulation by enamel matrix derivate in human alveolar osteoblasts / C. Galli, G. M. Macaluso, S. Guizzardi [et al.] // Journal of Periodontology 2006. – № 77. – P. 1223-1228.
11. Guida L. In vitro biologic response of human bone marrow stromal cells to enamel matrix derivative / L. Guida, M. Annunziata, F. Carinci [et al.] // Journal of Periodontology 2007. – № 78. – P. 2190-2196.
12. Hagenaaers S. Soft-tissue wound healing following periodontal surgery and Emdogain applicaton / S. Hagenaaers, P. G. H. Louwerse, M. F. Timmerman [et al.] // J Clin Periodontol 2004. – № 31. – P. 850-856.
13. Hammastrum L. Enamel matrix, cementum development and regeneration / L. J. Hammastrum // Clin Periodontol. – 1997. – № 24. – P. 658-668.
14. Hammastrum L. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins / L. Hammastrum, L. Heijl, S. Gestrelus // J Clin Periodontol. – 1997. – № 24. – P. 669-677.
15. Linares A. Guided tissue regeneration – deproteinized bovine bone mineral or papilla preservation flaps alone for treatment of intrabony defects. II: radiographic predictors and outcomes. European Research Group on Periodontology (Ergoperio) / A. Linares, P. Cortellini, N. P. Lang, J. Suvan J. [et al.] // J Clin Periodontol. – 2006. – № 33. – P. 351-358.
16. Sculean A. Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration / A. Sculean, N. Donos, P. Windisch [et al.] // J Periodontal Res. – 1999. – № 34. – P. 310-322.

УДК: 616.314.13-085:611-081.41:612.08

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРЯМОГО ВПЛИВУ ЕМАЛЕВИХ МАТРИЧНИХ ПРОТЕЇНІВ НА ОСТЕОГЕННІ КЛІТИНИ-ПОПЕРЕДНИКИ КІСТКОВОГО МОЗКУ IN VITRO

Браун Ю. Є.

Резюме. Комплексне лікування генералізованого пародонтиту II, II-III ступенів включає проведення хірургічної фази, яка має на меті регенерацію тканин пародонта з тривалою ремісією захворювання. Метою даного дослідження було визначити остеогенний потенціал остеогенних клітин – попередників кісткового мозку людини (колонієутворюючих одиниць фібробластів – КУОФ) під впливом Emdogain ex vivo. Клонування КУОФ кісткового мозку проводили згідно методики Фріденштейна О. Я. (1973) в модифікації Астахової В. С. (1982). Для дослідження використовували губчасту кісткову тканину. Клонування клітин здійснювалось згідно методики протягом 14 днів. Для дослідження прямого впливу ЕМП – Emdogain на клонування КУОФ кісткового мозку людини було проведено 4 серії експериментів ex vivo. I група – в культуральний флакон протягом посадки матеріалу до клітин кісткового мозку додавали "Pref-Gel". II група – з додаванням "Pref-Gel" і "Emdogain". III група – з додаванням лише "Emdogain". IV група – без додавання будь-яких зазначених препаратів (контрольна група). Регенераторний потенціал кісткової тканини оцінювали згідно значення показника ефективності клонування КУОФ (ЕККУОФ) кісткового мозку людини серед 10^5 ядровміщуючих клітин. Статистичний аналіз проводили в програмі "Statistica".

Результати показали, що у I та II групах експерименту в 6 випадках (66,7%) при додаванні травильного гелю Pref-Gel та комбінації Pref-Gel з Emdogain ріст стромальних фібробластів не спостерігався, ЕККУОФ = 0. В III групі експеримента ріст КУОФ спостерігався в усіх культуральних флаконах (33,3%) з ЕККУОФ = 13,23-16,35. В середньому з цієї серії виросли 145 колоній КУОФ з ЕККУОФ $15,10 \pm 0,95$ серед 10^5 ядровміщуючих клітин. В IV групі (контрольній) ріст КУОФ спостерігався у всіх культуральних флаконах з ЕККУОФ від 7,19-15,83. В середньому в цій серії виросли 120 колоній КУОФ з ЕККУОФ $12,48 \pm 1,24$ серед 10^5 ядровміщуючих клітин. Отримані дані свідчать про наявність прямого пошкоджуючого впливу на КУОФ "Pref-Gel" та наявність остеодуктивних властивостей у "Amdogain".

Ключові слова: генералізований пародонтит, регенерація, емалеві матричні протеїни, Emdogain, остеогенні клітини-попередники кісткового мозку людини, остеоіндукція.

УДК: 616.314.13-085:611-081.41:612.08

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЯМОГО ВЛИЯНИЯ ЭМАЛЕВЫХ МАТРИЧНЫХ ПРОТЕИНОВ НА ОСТЕОГЕННЫЕ КЛЕТКИ-ПРЕДШЕСТВЕННИКИ КОСТНОГО МОЗГА IN VITRO

Браун Ю. Е.

Резюме. Комплексное лечение генерализованного пародонтита II, II-III ступени включает проведение хирургической фазы, целью которой является регенерация тканей пародонта с длительной ремиссией заболевания. Целью данного исследования было исследование остеогенного потенциала остеогенных клеток – предшественников костного мозга человека (колониеобразующих единиц фибробластов – КОЕф) под влиянием Emdogain ex vivo. Клонирование КОЕф костного мозга человека проводили согласно методики Фриденштейна А. Я. (1973) в модификации Астаховой В. С. (1982). Для исследования использовали губчатую костную ткань. Клонирование клеток осуществляли согласно методики на протяжении 14 дней. Для исследования прямого влияния ЭМП – Emdogain на клонирование КОЕф костного мозга человека было проведено 4 серии экспериментов ex vivo. I группа – в культуральный флакон на протяжении посадки материала к клеткам костного мозга человека добавляли “Pref-Gel”. II группа – с добавлением “Pref-Gel” и “Emdogain”. III группа – с добавлением только “Emdogain”. IV группа – без добавления каких-либо указанных препаратов (контрольная группа). Регенераторный потенциал костной ткани оценивали согласно значения показателя эффективности клонирования КОЕф (ЭККОЕф) костного мозга человека среди 10^5 ядродержащих клеток. Статистический анализ проводили в программе “Statistica”.

Результаты показали, что в I и II группах эксперимента в 6 случаях (66,7%) при добавлении травильного геля Pref-Gel и комбинации Pref-Gel с Emdogain, рост стромальных фибробластов не наблюдался, ЭККОЕф = 0. В III группе эксперимента рост КОЕф наблюдался во всех культуральных флаконах (33,3%) с ЭККОЕф = 13,23-16,35. В среднем с этой серии выросли 145 колоний КОЕф с ЭККОЕф $15,10 \pm 0,95$ среди 10^5 ядродержащих клеток. В IV группе (контрольной) рост КОЕф наблюдался во всех культуральных флаконах с ЭККОЕф от 7,19-15,83. В среднем в этой серии выросли 120 колоний КОЕф с ЭККОЕф $12,48 \pm 1,24$ среди 10^5 ядродержащих клеток. Полученные данные свидетельствуют о наличии прямого повреждающего влияния на КОЕф “Pref-Gel” и наличия остеоиндуктивных свойств у “Amdogain”.

Ключевые слова: генерализованный пародонтит, регенерация, эмалевые матричные протеины, Emdogain, остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека, остеоиндукция.

UDC: 616.314.13-085:611-081.41:612.08

THE INVESTIGATION OF DIRECT ACTION OF ENAMEL MATRIX PROTEINS ON OSTEOGENOUS PROGENITOR HUMAN BONE-MARROW CELLS IN VITRO

Braun I. E.

Abstract. Generalized periodontitis (GP) became to be widely spread disease among other types of periodontal diseases, staying until present times as unsolved clinical problem because of completely untreated. The longterm chronic course of the GP became to be one of the main detail that accompanying by progressive loss of periodontal tissues. During this process such significant structures as: alveolar bone, periodontal ligament and root cement are injured by pathological process, whose are characterized by very slow reparation, need very longtime terms for regeneration that depends on condition of neighboring tissues of periodontal wound. The complicity of periodontal tissues structure and their anatomical connections during functioning determine the main problems in reaching aimed regeneration using modern methods. The tooth loss or loss of group of teeth still considered as frequent consequence of not forehanded treatment and as a result of GP further progression. However, according to modern investigations dedicated to periodontal tissues regeneration, it was stated that the periodontal regeneration can be reached successfully. Due to creation of appropriate micro surrounding conditions for cells, that can mimic the course of periodontal ligament formation process and cementogenesis, it became to be possible to reach regeneration of periodontal tissues. This became to be possible under action of enamel matrix proteins (EMD) in form of Emdogain. Plural scientific works of different authors showed that different types of cells including stromal progenitor cells of bone marrow can take part in regeneration of periodontal tissues. EMD are characterized by influencing on different cell types and also due to precipitation on root surface, they combine appropriate micro surrounding for cementoblasts, osteoblasts and their progenitors.

The aim of current study was to investigate the direct action of “Amdogain” on osteogenous progenitor cells – colony-forming fibroblast units (CFFU) of human bone-marrow ex vivo and to evaluate presence of its osteoinductive properties.

Cloning of CFFU of human bone-marrow was provided according to methodic of Fridenshtein O. Y. (1973) in modification of Astachova V. S. (1982). According to stated methodic, cancellous bone was taken for investigation. Under requested conditions, the investigation of colony growth of GFFU was provided. According to presented study, the investigation of osteogenous potential of GFFU was provided under action of “Amdogain” and “Pref-Gel” that both are main components recommended for usage in regenerative periodontal procedures. The 4 experimental series of CFFU cloning of human bone-marrow were provided: 1st group – with adding of etching gel “Pref-Gel” into feeding solution in cultural flacon; 2nd group – with adding of “Pref-Gel” with “Amdogain” into feeding solution in cultural flacon; 3rd group – with adding of “Amdogain” only into feeding solution in cultural flacon; 4th – without adding of any preparations into feeding solution in cultural flacon (control). The action was evaluated according to

cloning effectiveness of CFFU of human bone-marrow among 10^5 nucleus-containing cells. 9 experimental and 6 control colonies were cultivated.

The obtained results showed in 1st and 2nd experimental groups the growth of stromal fibroblasts wasn't detected. The effectiveness of CFFU cloning = 0. In 3rd group in the mean 145 colonies of CFFU grew up with cloning effectiveness of $15,10 \pm 0,95$. In control group in the mean 120 colonies grew up. The cloning effectiveness was $12,48 \pm 1,24$ among 10^5 nucleus-containing cells. Ad oculus the colonies from control and investigated groups weren't differ from each other.

The presented investigated revealed that "Pref-Gel" and combination of "Pref-gel" with "Amdogain" completely depresses proliferation and differentiation of CFFU in human bone-marrow ex vivo. These data can show the direct chemical action on vital stromal bone cells due to action of "Pref-Gel" which is 24% EDTA. This chemical component may change pH in feeding solution in cultural flacon, leading to direct chemical stress in vital bone cells and their death. The obtained chemical changes were not enhanced under additional adding of "Amdogain" after into cultural flacon. However, separate adding of "Amdogain" into cultural flacon enhanced on 20,8% in comparison with control group, amount of CFFU colonies in bone-marrow, increasing specific gravity of multilayer colonies, giving evidence about presence of its osteoinductive properties.

Keywords: generalized periodontitis, regeneration, enamel matrix proteins, Emdogain, osteogenous progenitor human bone marrow cells, osteoinduction.

Рецензент – проф. Скрипніков П. М.

Стаття надійшла 01.02.2016 року