

DOI 10.29254/2077-4214-2019-2-1-150-290-294

УДК 611.018.26:575.53

*Бамбуляк А. В., Кузняк Н. Б., Перебийніс П. П., Ткачик С. В.*

### РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ЗРАЗКІВ З ВМІСТОМ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

Буковинський державний медичний університет (м. Чернівці)

bambuljak.andrij@bsmu.edu.ua

**Вступ.** Відновлення кісткової тканини залишається складною і актуальною задачею для сучасної хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії. В останні роки ведуться активні пошуки імплантатного матеріалу, який за своїми властивостями міг би відповідати аутокістці [1].

Найчастіше в стоматологічній практиці використовують остеоіндуктивні матеріали на основі гідроксиапатиту, зокрема біологічного походження. В даний час тканнна інженерія є однією з наймолодших галузей в медицині, що базується на принципах трансплантації тканин. Міждисциплінарний підхід котрий в ній використовується направлений в першу чергу на створення нових біокомпозиційних матеріалів для відновлення втрачених функцій окремих тканин або органів в цілому [2]. Основні принципи даного підходу полягають в розробці та застосуванні при імплантації в ушкоджений орган або тканину носіїв з біодеградуємих матеріалів, котрі використовуються в поєднанні або з донорськими клітинами і / або з біоактивними речовинами [1,3].

Технології тканнної інженерії дозволяють створювати тканнні еквіваленти кісткової тканини, використовуючи аутогенні стромальні клітини, нанесені на біосумісний синтетичний або біологічний матеріал тканнно-інженерної конструкції [4]. Механізм регенерації заснований на відновленні втраченої в результаті захворювання або травми кісткової тканини за рахунок проліферації, диференціювання клітин що трансплантуються, та так само активізації власних репаративних процесів в зоні ураження після трансплантації тканнно-інженерної конструкції. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини дорослого організму (ММСК) є оптимальними для застосування в практичній медицині, котрі найкращим чином підходять для регенерації кісткової тканини; мають здатність до спрямованої диференціювання в стовбурові остеогенні клітини попередники, а висока швидкість проліферації ММСК дозволяє наростити достатню кількість клітин для трансплантації [2,5,6].

Одним з перспективних джерел ММСК є жирова тканина (ЖТ). Тканнно-інженерна конструкція котра буде трансплантуватися в зону дефекту, дозволить домогтися відновлення втраченої тканини в результаті проліферації та диференціювання клітин що трансплантуються [7,8]. Використання тканнно-інженерної конструкцій на основі ММСК ЖТ дозволить скоротити терміни лікування хворих з вираженим дефіцитом кісткової тканини [9].

**Мета роботи.** Вивчення біосумісності зразків імплантатного матеріалу на клітинному рівні з вмі-

стом мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини (ММСК-ЖТ).

**Об'єкт і методи дослідження.** До числа експериментальних тест-систем, що дозволяють встановити безпосередній вплив факторів при контакті імплантатного матеріалу на клітинному рівні, без втручання в процес захисних систем організму, відносяться клітинні і тканнні культури, які можливо розглядати як прискорений метод дослідження у токсикологічному експерименті [10].

Як джерело клітин використовували підшкірну клітковину 15 лабораторних щурів, що в умовах культивування, викликає ріст фібробластичних і фібробластоподібних елементів [11]. Об'єктами дослідження були вибрані наступні зразки:

№ 1 – ММСК-ЖТ, що пройшли остеогенне диференціювання;

№ 2 – ММСК-ЖТ з остеогенним диференціюванням з додаванням збагаченої тромбоцитами плазми крові;

№ 3 – „Колапан” з нанесеною тканнною культурою клітин ММСК-ЖТ, що пройшла остеогенне диференціювання;

№ 4 – „Колапан” з нанесеною тканнною культурою клітин ММСК-ЖТ, що пройшла остеогенне диференціювання та збагаченої тромбоцитами плазми крові.

Дослідження біосумісності методом клітинної культури *in vitro* проводилось відповідно з Робочою інструкцією № 04/2013 – ВЛ [12].

Культури були досліджені методом експлантації в згустку плазми у флаконах Кареля. При дослідженні вивчаємих зразків на 3, 7 та 10 добу культивування тканнних еквівалентів, модельне середовище 199 замінювали витяжками з досліджуваних культур. Витяжку готували у співвідношенні маси зразків до об'єму модельного середовища як 100 мг/мл. Час контакту зразків з модельним середовищем становив 3 доби, при температурному режимі екстракції +37°C [13].

Піддослідних щурів виводили з експерименту шляхом передозування ефіром. В асептичних умовах з задньої половини спини виділяли фрагменти підшкірної клітковини розміром 1 x 1 см. Досліджувані зразки переносили в фізіологічний розчин, що містив канаміцин, після чого промивали фрагменти клітковини потрібною порцією фізіологічного розчину без антибіотика. Потім зразки відокремлювали на окремі експлантати по 1,5 мм. Досліджувані тканнні еквіваленти переносили у флакони Кареля (по 4 – 5 експлантатів) з поживною сумішшю, що містила плазму півня і середовище 199. Додавали ембріональний екстракт, виготовлений з 10–12-добових

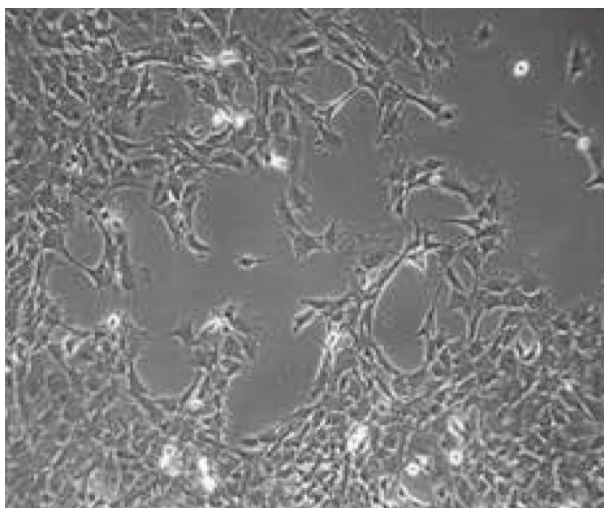


Рис. 1. Культура клітин фібробластів на поверхні ММСК-ЖТ з остеогенним диференціюванням через 3 дні від початку культивування. 36. x 100.

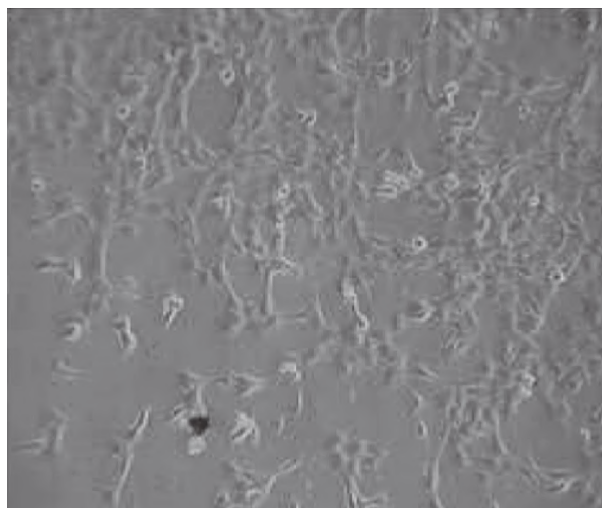


Рис. 3. Культура клітин фібробластів на поверхні „Колопану” з нанесеною культурою клітин ММСК-ЖТ через 3 дні від початку культивування. 36. x 100.

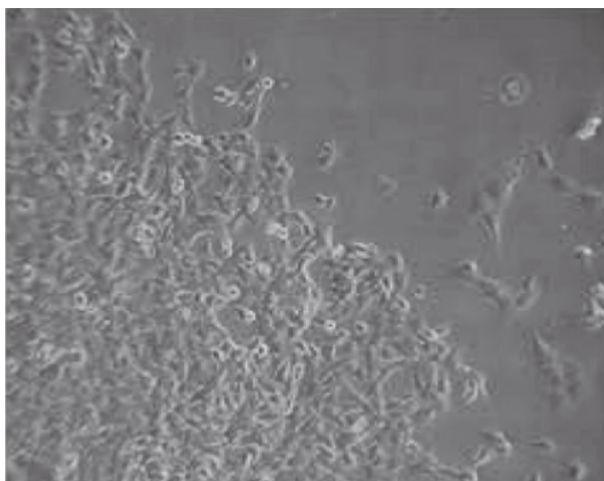


Рис. 2. Культура клітин фібробластів на поверхні ММСК-ЖТ з остеогенним диференціюванням з ЗТП через 3 дні від початку культивування. 36. x 100.

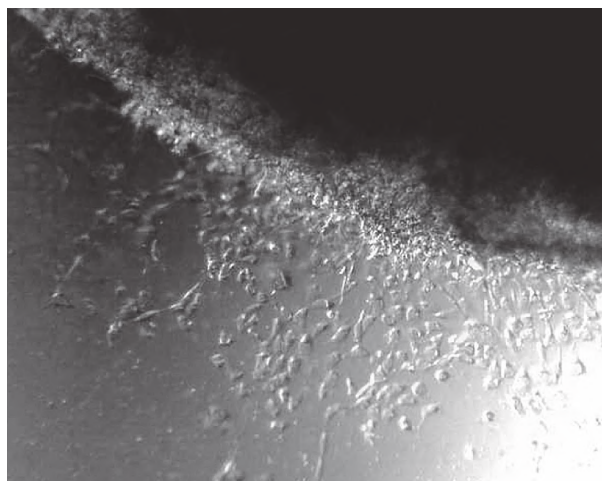


Рис. 4. Культура клітин фібробластів на поверхні зразка № 4 (ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колопан”) через 3 дні від початку культивування. 36. 4 x 150.

ембріонів курчат, а після формування твердої фази – вносили суміш сироватки крові великої рогатої худоби і витяжки дослідних зразків на основі ММСК-ЖТ. У контрольні флакони додавали середовище 199.

Інкубацію культур проводили при +37 С. Заміну рідкої фази живильного середовища в контрольній і дослідних групах проводили через 3, 7, 10 діб культивування.

З метою стандартизації характеру росту їхні зони класифікували на компактну, сіткоподібну і зону мігруючих клітин зростаючих фібробластичних тканин [14].

Експериментальні дослідження було проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Мікроскопічне дослідження поверхні зразків із культурою фібробластів показало їх задовільну адгезію на

поверхні зубів через 5 днів культивування (**рисунк 1-4**).

При дослідженні зразка № 1 (ММСК-ЖТ, з остеогенним диференціюванням) (**рисунк 1**), привертало увагу, що будова клітин набувала округлої та овальної форми, що свідчило про їх деструкцію та пошкодження.

Візуалізація зразка № 2 (ММСК-ЖТ, збагачена тромбоцитами плазма крові) на 5 добу спостережень показала, що клітини мали інвагінації та відростки (**рисунк 2**).

На 5 добу спостережень, при візуальному вивченні зразка № 3 („Колопан”, з нанесеною культурою клітин ММСК-ЖТ) спостерігались клітини з чисельними інвагінаціями та відростками (**рисунк 3**).

При дослідженні зразків № 4 (ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колопан”) на 5 добу досліджень (**рисунк 4**), ознаки росту проявлялися міграцією фібробластичних елементів, що мали веретеноподібну та полігональну форми, з утворенням первинної зони за рахунок тяжів.

На 7 добу культивування у дослідних зразках № 2, № 3, № 4 відбувалося формування трьох зон росту: компактної – із клітин полігональної та веретенопо-

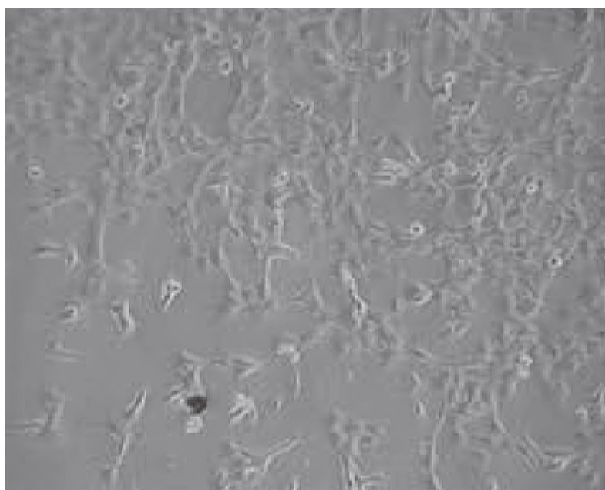


Рис. 5. Культура клітин фібробластів на поверхні ММСК-ЖТ з остеогенним диференціюванням через 7 діб від початку культивування. 36. x 100.

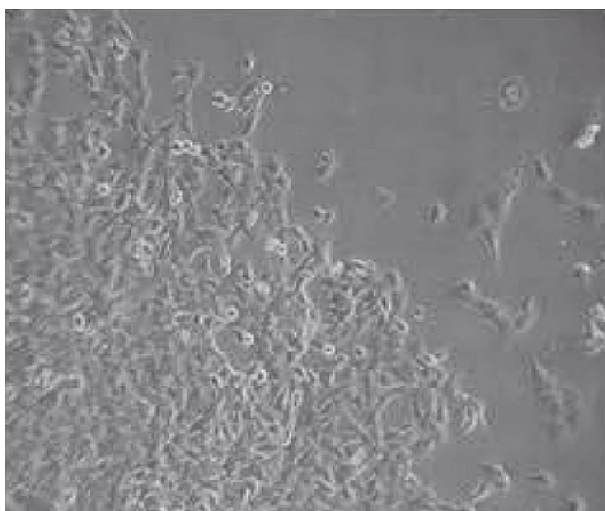


Рис. 6. Культура клітин фібробластів на поверхні ММСК-ЖТ з остеогенним диференціюванням з ЗТП через 7 діб від початку культивування. 36. x 100.

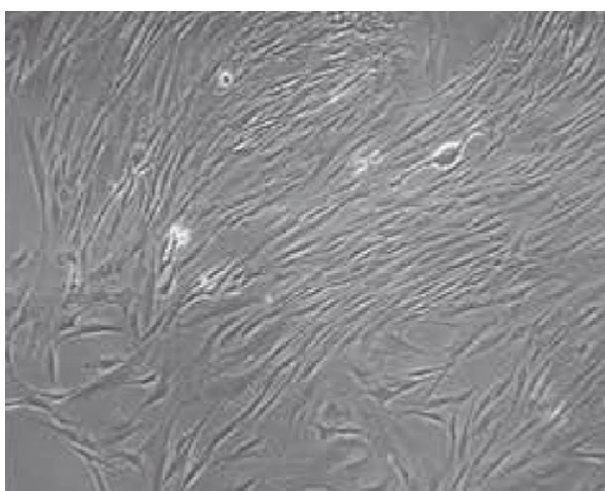


Рис. 7. Культура клітин фібробластів на поверхні „Колопан” з нанесеною культурою ММСК-ЖТ, що пройшла остеогенну диференціацію через 7 діб від початку культивування. 36. x 100.

дібної форми; сіткоподібної – з тяжів та пучків клітин, що були розташовані сіткоподібно та зони одиничних мігруючих елементів веретеноподібної форми.

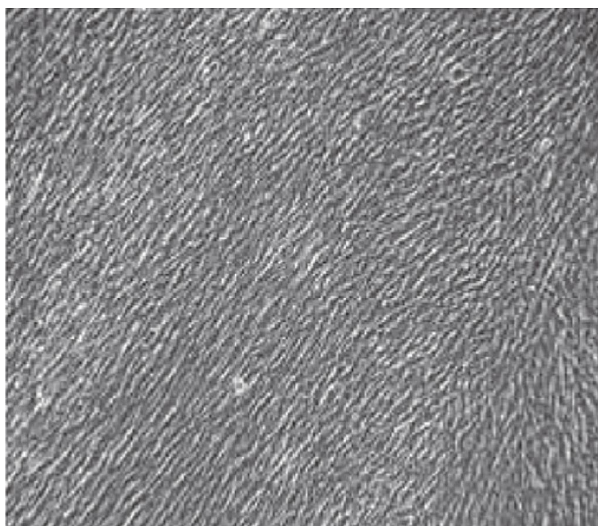


Рис. 8. Культура клітин фібробластів на поверхні зразка № 4 („Колопан” + ММСК-ЖТ + ЗТП).



Рис. 9. Ріст культури тканин фібробластів на 10 добу культивування у зразку № 1. 36. x 150.

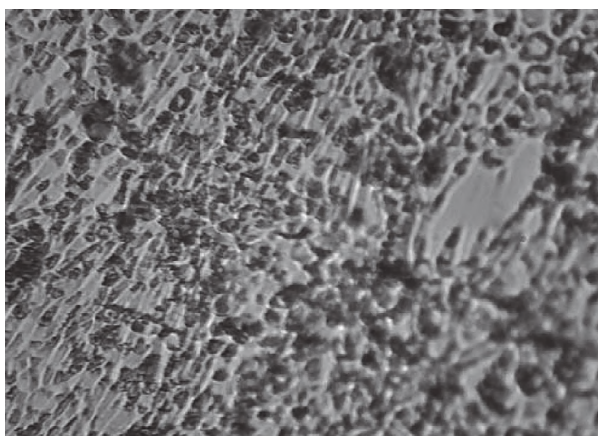


Рис. 10. Дегенеративні зміни в культурі фібробластів на 10 добу культивування у зразку № 2. 36. x 150.

Зовнішні характеристики та поверхня росту клітин не відрізнялась від контрольних зразків (рисунком 5, 6, 7, 8).

На 10 добу культивування у дослідних зразках, як і у контролі, були збільшені площі компактної та сіткоподібної зони росту та зони мігруючих фібробластів. При цьому, спостерігався тканиноподібний ріст клітин. Візуалізація компактної та сіткоподібних зон



Рис. 11. Ріст культури тканин фібробластів на 10 добу культивування у зразку № 3. 36. x 150.

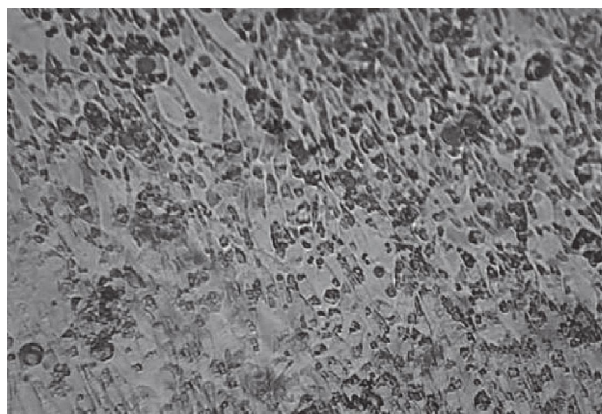


Рис. 12. Дегенеративні зміни в культурі фібробластів на 10 добу культивування у зразку № 4. 36. x 150.



Рис. 13. Мікрофотографія культур ММСК-ЖТ щурів, направлено диференційованих в остеогенному напрямку на 7 добу культивування (фазовий контраст). 36. x 400.

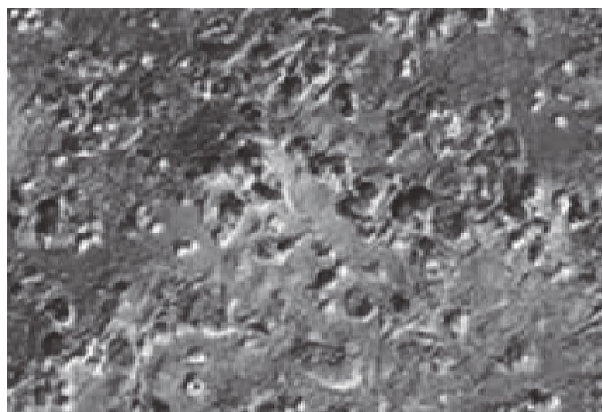


Рис. 14. Мікрофотографія культур ММСК-ЖТ щурів, направлено диференційованих в остеогенному напрямку на 10 добу культивування (фазовий контраст). 36. x 200.

дослідних зразків, що вивчалися, виявила ознаки початку дегенеративних змін, котрі характеризувалась округленням форми і вакуолізацією клітин. Дана тенденція була максимально виражена у зразках № 2 та № 4 (рисунки 9, 10, 11, 12).

Слід відзначити, що вже на 10 добу спостережень клітинна популяція досліджуваних фрагментів вступала у фазу дегенерації, що проявлялося значною вакуолізацією цитоплазми та зернистому переродженні її в клітинах, як і у контрольних зразках (рисунко 13, 14).

**Висновки.** Біосумісність тканинних еквівалентів кісткової тканини на основі ММСК-ЖТ характеризувалась збільшенням площі компактної та сіткоподібної зон росту та зони мігруючих фібробластів. На 10 добу спостережень клітинна популяція досліджува-

них фрагментів вступала в фазу дегенерації, що виявлялось в значній вакуолізації цитоплазми та в її зернистому переродженні.

Отже, тканинні еквіваленти кісткової тканини на основі ММСК-ЖТ можуть бути кандидатами для застосування у регенеративній медицині, а дослідження їх застосування на експериментальних тваринах надали можливість для розширення уявлення щодо характеристик ММСК-ЖТ з метою оптимізації їх подальшого клінічного застосування і реалізації нових підходів у різних напрямках стоматології.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому є перспективним використання зразків на основі ММСК-ЖТ для застосування у регенеративній медицині, та зокрема в стоматології.

## Література

1. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 2002;12(13):4279-95.
2. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies. *Tissue Eng.* 2001;2(7):211-28.
3. Niemeyer P, Krause U, Kasten P. HLA-Independent Cell Therapy for Tissue Engineering of Bone and Cartilage. *Current Stem Cell Research and Therapy.* 2012;1(1):21-7.
4. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J. Med.* 2011;344(5):385-6.
5. Roodman GD. Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif. Tissue Int.* 2013;1(61):94-8.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 2011;284:143-7.
7. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2013;5:362-9.
8. Yamanaka S. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* 2011;363:2079-87.
9. Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in Molecular Medicine.* 2014;15:59-68.
10. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 2014;6:230-47.

11. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2016;275:9645-52.
12. Muller AM, Mehrkens A, Schafer DJ. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur. Cell Mater*. 2014;19:127-35.
13. Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Potential therapeutic applications of muscle derived mesenchymal stem and progenitor cells. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2015;4(10):505-17.
14. Toupadakis CA, Wong A, Genetos DC. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am. J. Vet. Res*. 2013;10(71):1237-45.

### РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ЗРАЗКІВ З ВМІСТОМ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

**Бамбуляк А. В., Кузняк Н. Б., Перебийніс П. П., Ткачик С. В.**

**Резюме.** *Мета роботи.* Вивчення біосумісності зразків імплантаційного матеріалу на клітинному рівні з вмістом мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини.

*Об'єкт і методи.* Як джерело клітин використовували підшкірну клітковину 15 лабораторних щурів, що в умовах культивування, викликає ріст фібробластичних і фібробластоподібних елементів. Дослідження біосумісності методом клітинної культури *in vitro* проводилось відповідно з Робочою інструкцією № 04/2013 – ВЛ.

*Результати.* Біосумісність тканинних еквівалентів кісткової тканини на основі ММСК-ЖТ характеризувалась збільшенням площі компактної та сіткоподібної зон росту та зони мігруючих фібробластів. На 10 добу спостережень клітинна популяція досліджуваних фрагментів вступала в фазу дегенерації, що виявлялось в значній вакуолізації цитоплазми та в її зернистому переродженні.

*Висновки.* Отже, тканинні еквіваленти кісткової тканини на основі ММСК-ЖТ можуть бути кандидатами для застосування у регенеративній медицині, а дослідження їх застосування на експериментальних тваринах надали можливість для розширення уявлення щодо характеристик ММСК-ЖТ з метою оптимізації їх подальшого клінічного застосування і реалізації нових підходів у різних напрямках стоматології.

**Ключові слова:** мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини, остеопластичні матеріали, біосумісність.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ОБРАЗЦОВ С СОДЕРЖАНИЕМ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

**Бамбуляк А. В., Кузняк Н. Б., Перебийнос П. П., Ткачик С. В.**

**Резюме.** *Цель работы.* Изучение биосовместимости образцов имплантационного материала на клеточном уровне с содержанием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани.

*Объект и методы.* В качестве источника клеток использовали подкожную клетчатку 15 лабораторных крыс, которая в условиях культивирования, вызывает рост фибробластических и фибробластоподобных элементов. Исследование биосовместимости методом клеточной культуры *in vitro* проводилось в соответствии с Рабочей инструкцией № 04/2013 – ВЛ.

*Результаты.* Биосовместимость тканевых эквивалентов костной ткани на основе ММСК-ЖТ характеризовалась увеличением площади компактной и сетевидной зоны роста и зоны мигрирующих фибробластов. На 10 сутки наблюдений клеточная популяция исследуемых фрагментов вступала в фазу дегенерации, что проявлялось значительной вакуолизацией цитоплазмы и ее зернистом перерождении.

*Выводы.* Итак, тканевые эквиваленты костной ткани на основе ММСК-ЖТ могут быть кандидатами для применения в регенеративной медицине, а исследования их применения на экспериментальных животных предоставили возможность для расширения представления о характеристиках ММСК-ЖТ с целью оптимизации их дальнейшего клинического применения и реализации новых подходов в различных направлениях стоматологии.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, остеопластические материалы, биосовместимость.

### THE RESULTS OF THE STUDY OF BIOCOMPATIBILITY SAMPLES THAT CONTAINING MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS OF ADIPOSE TISSUE

**Bambuliak A. V., Kuzniak N. B., Perebyinis P. P., Tkachyk S. V.**

**Abstract.** *Objective.* Study of biocompatibility of samples of implantation material at cellular level with content of multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue.

*Object and methods.* As a source of cells, the subcutaneous tissue of 15 laboratory rats was used, which, under cultivation, causes the growth of fibroblastic and fibroblast-like elements. The biocompatibility study by cell culture method *in vitro* was carried out in accordance with the Work Instruction No. 04/2013 -V.L.

*Results.* The biocompatibility of tissue equivalents of bone tissue on the basis of MMSC-AT was characterized by an increase in the area of compact and mesh-shaped growth zones and the zone of migratory fibroblasts. At the 10th day of observation, the cell population of the investigated fragments entered the degeneration phase, which was manifested in significant vacuolization of the cytoplasm and its granular rebirth.

*Conclusions.* Consequently, the tissue equivalent of bone tissue based on MMSC-AT can be candidates for regenerative medicine, and the study of their use in experimental animals gave an opportunity to broaden the understanding of the characteristics of MMSC-AT in order to optimize their subsequent clinical application and the implementation of new approaches in different directions of dentistry.

**Key words:** multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue, osteoplastic materials, biocompatibility.

*Рецензент – проф. Ткаченко І. М.*

*Стаття надійшла 05.05.2019 року*