

DOI: 10.26693/jmbs05.06.059

УДК 616.31:602.9:616-008.9:611.018.4

Бамбуляк А. В., Кузняк Н. Б., Дмитренко Р. Р., Ткачик С. В., Гончаренко В. А.

МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ЗРАЗКІВ З ВМІСТОМ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Буковинський державний медичний університет, Чернівці

mocart_83@mail.ru

Мета роботи – дослідити біосумісність зразків з вмістом мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини для заміщення кісткових дефектів.

Зразки жирової тканини були отримані з ділянки шиї 60 експериментальних тварин (білі щури лінії Вістар). Мультипотентні мезенхімальні клітини жирової тканини (ММСК-ЖТ) отримували шляхом подрібнення жирової тканини щурів в 0,1 % колагенази 1А. Дослідження біосумісності методом клітинної культури *in vitro* проводилось відповідно з Робочою інструкцією № 04/2013 – ВЛ. Культури були досліджені методом експлантації в згустку плазми у флаконах Кареля. З метою стандартизації характеру росту їхні зони класифікували на компакту, сіткоподібну і зону мігруючих клітин зростаючих фібробластичних тканин. Статистичне обчислення результатів клінічних і лабораторних досліджень здійснювали за загальноприйнятими методами.

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 вивчаємих дослідних зразків, виявила ознаки початку дегенеративних змін, яка характеризувалась у вигляді округлення форми і вакуолізації клітин. Дана тенденція була максимально виражена у зразках № 2 та № 4. Слід відзначити, що вже на 10 добу спостережень клітинна популяція досліджуваних фрагментів вступала у фазу дегенерації, що виявлялося в значній вакуолізації цитоплазми та зернистому переродженні її в клітинах, як і у контрольних зразках

Отже, тканинні еквіваленти кісткової тканини на основі ММСК-ЖТ можуть бути кандидатами для застосування у регенеративній медицині, а дослідження їх застосування на експерименталь-

них тваринах дадуть 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, збагачена тромбоцитами плазма, остеогенне диференціювання, зони росту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота являє собою фрагмент науково-дослідної роботи кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії Буковинського державного медичного університету «Багатопротиповідний підхід до діагностики, лікування та профілактики основних стоматологічних захворювань, з збереження регенеративних властивостей тканин та відновлення захисних властивостей анатомічних структур у жителів Північної Буковини», № державної реєстрації 0116U002929.

Вступ. Застосування стовбурових клітин і тканинної інженерії в стоматології представляє великий інтерес, так як забезпечує інноваційний підхід для створення матеріалу, який може бути використаний не тільки для відтворення втрачених тканин, але і для забезпечення регенерації кісткової тканини. Особливістю кісткової тканини щелеп є те, що при перерозподілі або втрати функціонального навантаження в ній швидко починаються процеси атрофії. Видалення зубів призводить до втрати кісткової тканини, яка відбувається не тільки в зоні віддаленого зуба, але і зачіпає близько 20% обсягу лунки навколо неї [1-3]. Для запобігання резорбції кістки, лунку видаленого зуба рекомендують заповнювати кістковим матеріалом. Однак, за даними різних дослідників, при заповненні лунки кістковим матеріалом зменшується обсяг кров'яного згустку, в зв'язку з чим зменшується і кількість клітинних



Рис. 3. Культура клітин фібробластів на поверхні «Колапану» з нанесеною культурою клітин ММСК-ЖТ через 3 дні від початку культивування. Зб. $\times 100$

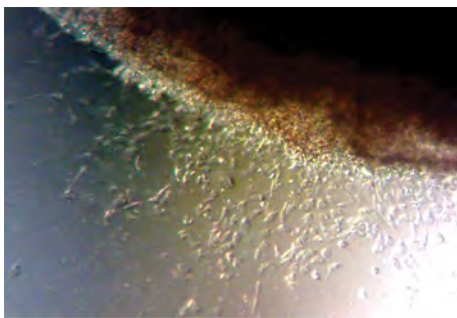


Рис. 4. Культура клітин фібробластів на поверхні зразка № 4 (ММСК-ЖТ + ЗТП + «Колапан») через 3 дні від початку культивування. Зб. 4×150

На 5 добу спостережень, при візуальному вивченні зразка № 3 («Колапан», з нанесеною культурою клітин ММСК-ЖТ) спостерігались клітини з чисельними інвазіями та відростками (**рис. 3**).

При дослідженні зразків № 4 (ММСК-ЖТ + ЗТП + «Колапан») на 5 добу досліджень (**рис. 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: компакної – із клітин полігональної та веретеноподібної форми; сіткоподібної – з тяжів та пучків клітин, що були розташовані сіткоподібно та зони одиничних мігруючих елементів веретеноподібної форми. Зовнішні характеристики та поверхня росту клітин не відрізнялась від контрольних зразків (**рис. 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 вивчаємих дослідних зразків, виявила ознаки початку дегенеративних змін, яка

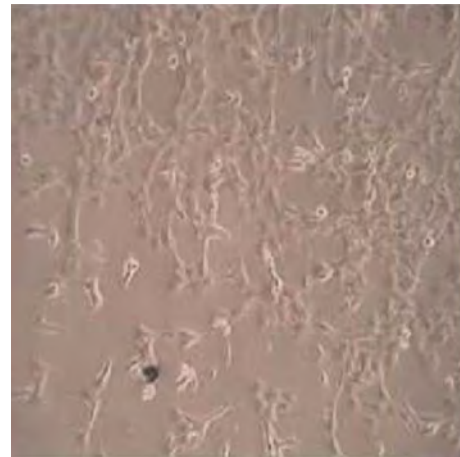


Рис. 5. Культура клітин фібробластів на поверхні ММСК-ЖТ з остеогенним диференціюванням через 7 днів від початку культивування. Зб. $\times 100$



Рис. 6. Культура клітин фібробластів на поверхні ММСК-ЖТ з остеогенним диференціюванням з ЗТП через 7 днів від початку культивування. Зб. $\times 100$

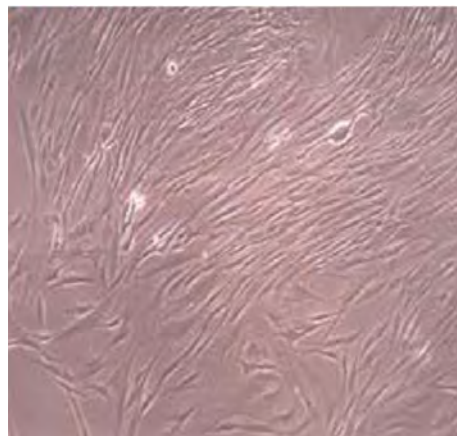


Рис. 7. Культура клітин фібробластів на поверхні «Колапан» з нанесеною культурою ММСК-ЖТ, що пройшла остеогенну диференціацію через 7 днів від початку культивування. Зб. $\times 100$

характеризувалась у вигляді округлення форми і вакуолізації клітин. Дана тенденція була максимально виражена у зразках № 2 та № 4 (**рис. 9, 10, 11, 12**).

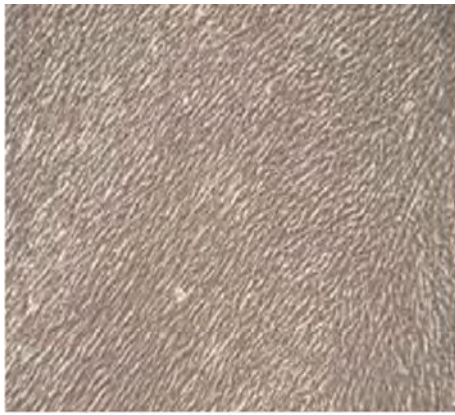


Рис. 8. Культура клітин фібробластів на поверхні зразка № 4 («Колапан» + ММСК-ЖТ + ЗТП). Зб. ×100

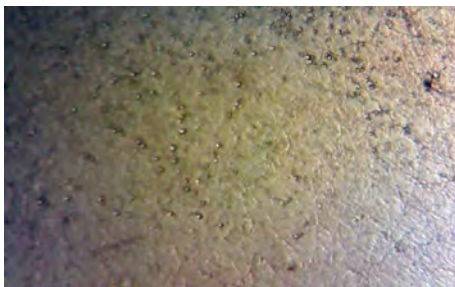


Рис. 9. Ріст культури тканин фібробластів на 10 добу культивування у зразку № 1. Зб. ×150

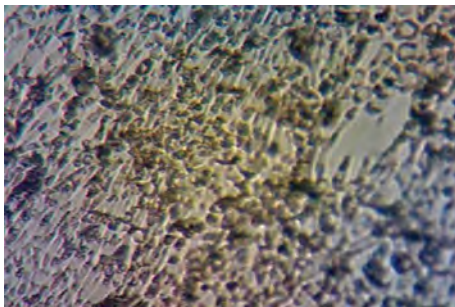


Рис. 10. Дегенеративні зміни в культурі фібробластів на 10 добу культивування у зразку № 2. Зб. ×150

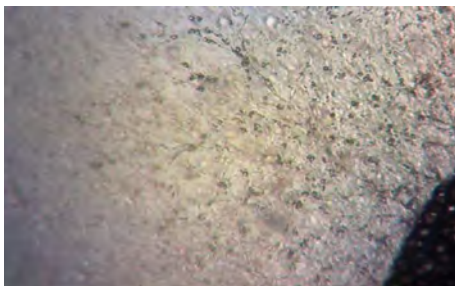


Рис. 11. Ріст культури тканин фібробластів на 10 добу культивування у зразку № 3. Зб. ×150

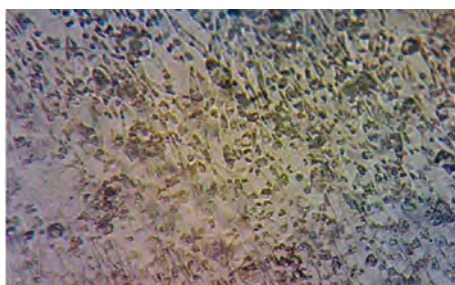


Рис. 12. Дегенеративні зміни в культурі фібробластів на 10 добу культивування у зразку № 4. Зб. ×150

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

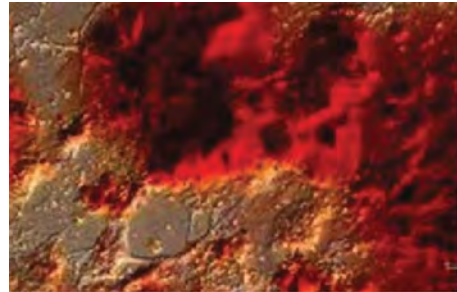


Рис. 13. Мікрофотографія культур ММСК-ЖТ щурів, направлено диференційованих в остеогенному напрямку на 7 добу культивування (фазовий контраст). Зб. ×400

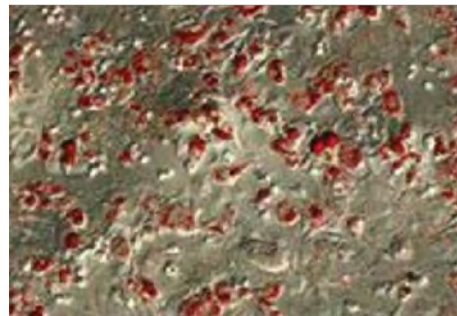


Рис. 14. Мікрофотографія культур ММСК-ЖТ щурів, направлено диференційованих в остеогенному напрямку на 10 добу культивування (фазовий контраст). Зб. ×200

Обговорення отриманих результатів. Біосумісність тканинних еквівалентів кісткової тканини на основі ММСК-ЖТ характеризувалась збільшенням площі компактної та сіткоподібної зон росту та зони мігруючих фібробластів, що співпадає з отриманими результатами [13]. На 10 добу спостережень клітинна популяція досліджуваних фрагментів вступала в фазу дегенерації, що виявлялось в значній вакуолізації цитоплазми та в її зернистому переродженні [6]. У результаті проведеного експериментального дослідження було розроблено новий спосіб створення тканинних еквівалентів кісткової тканини для заміщення кісткових дефектів, засноване на принципах вільного розподілу клітин у фібриновому згустку всередині матриць-носіїв. В якості джерела регенерації ТЕКТ виступають ММСК жирової тканини, збагачена тромбоцитами плазма та «Колапан». Матеріал, котрий використовувався, відповідає вимогам, які пред'являються до матеріалів для тканинної інженерії. Отримано інноваційний високотехнологічний

ТЕКТ для клінічного застосування. Ефективність застосування ТЕКТ підтверджена результатами експериментального дослідження [14].

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 надасть можливість для розширення уявлення щодо характеристик

ММСК-ЖТ з метою оптимізації їх подальшого клінічного застосування і реалізації нових підходів у різних напрямках стоматології.

Перспектива подальших досліджень. Планується провести ще ряд молекулярних, біохімічних, гістологічних, досліджень, щоб остаточно довести доцільність використання ММСК-ЖТ в реконструктивній медицині та зокрема в стоматології.

References

1. Coleman SR, Mazzola RF, Q L, Lee Pu. *Fat Injection: from filling to regeneration*. 2nd ed. NY: CRC Press; 2016. 900 p.
2. Mazurkevych AI, Maliuk MO, Tkachenko SM, Kharkevych, YuO. Study of biocompatibility of hemostatic sponges with the barrel cages of marrow of rabbit during cultivation of in vitro. *Bulletin of the Sumy National Agrarian University*. 2015; 1(34): 7-11.
3. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2015; 105: 1815-22. PMID: 15494428. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559
4. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2019; 43: 1482-90. PMID: 15827960. doi: 10.1002/eji.200425405
5. Mangashetti LS, Khapli SM, Wani MR. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca²⁺ signaling. *J Immunol*. 2017; 175: 917-25. PMID: 16002690. doi: 10.4049/jimmunol.175.2.917
6. Wang Y, Du Y, Yuan H, Pan Y, Wu J, Du X, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells enhance the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by promoting adiponectin excretion via the APPL1-ERK1/2 signaling pathway. *IUBMB Life*. 2020; 72(2): 296-304. doi: 10.1002/iub.2165
7. Roodman GD. Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int*. 2013; 1(61): 94-8. PMID: 8275387. doi: 10.1007/BF01673412
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 2015; 284: 143-7. PMID: 10102814. doi: 10.1126/science.284.5411.143
9. Nifant'ev I, Bukharova T, Dyakonov A, Goldshtein D, Galitsyna E, Kosarev M, et al. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived MSCs by non-toxic calcium poly(ethylene phosphate)s. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(24): 6242. doi: 10.3390/ijms20246242
10. Yamanaka S. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 2016; 363(1500): 2079-87. PMID: 18375377. PMID: PMC2610180. doi: 10.1098/rstb.2008.2261
11. Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in Molecular Medicine*. 2014; 15(2): 59-68. PMID: 19162546. doi: 10.1016/j.molmed.2008.12.003
12. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 2014; 6: 230-47. PMID: 5654088. doi: 10.1097/00007890-196803000-00009
13. Baer PC, Koch B, Hickmann E, Schubert R, Cinatl J Jr, Hauser IA, et al. Isolation, characterization, differentiation and immunomodulatory capacity of mesenchymal stromal/stem cells from human perirenal adipose tissue. *Cells*. 2019; 8(11):0. doi: 10.3390/cells8111346
14. Yanai R, Tetsuo F, Ito S, Itsumi M, Yoshizumi J, Maki T, et al. Extracellular calcium stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by enhancing bone morphogenetic protein-2 expression. *Cell Calcium*. 2019; 83: 102058. doi: 10.1016/j.ceca.2019.102058

УДК 616.31:602.9:616-008.9:611.018.4

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ОБРАЗЦОВ С СОДЕРЖАНИЕМ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бамбуляк А. В., Кузник Н. Б., Дмитренко Г. Г., Ткачик С. В., Гончаренко В. А.

Резюме. Цель работы – исследовать биосовместимость образцов с содержанием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани для замещения костных дефектов.

Образцы жировой ткани были получены из области шеи 60 экспериментальных животных (белые крысы линии Вистар). Мультипотентные мезенхимальные клетки жировой ткани (ММСК-ЖТ) получали

путем измельчения жировой ткани крыс в 0,1% коллагеназы 1А. Исследование биосовместимости методом клеточной культуры *in vitro* проводилось в соответствии с Рабочей инструкцией № 04/2013-ВЛ. Культуры были исследованы методом эксплантации в сгустке плазмы во флаконах Кареля. С целью стандартизации характера роста их зоны классифицировали на компактную, сетевидные и зону мигрирующих клеток, растущих фибробластических тканей. Статистические вычисления результатов клинических и лабораторных исследований осуществляли по общепринятым методикам.

На 10 сутки культивирования в опытных образцах, как и в контроле, были увеличены площади компактной и сетевидной зон роста и зоны мигрирующих фибробластов. При этом наблюдался тканевидный рост клеток. Визуализация компактной и сетевидной зоны изучаемых опытных образцов, показала признаки начала дегенеративных изменений, которая характеризовалась в виде округления формы и вакуолизации клеток. Данная тенденция была максимально выражена в образцах № 2 и № 4. Уже на 10 сутки наблюдений клеточная популяция исследуемых фрагментов вступала в фазу дегенерации, что проявлялось в значительной вакуолизации цитоплазмы и зернистом перерождении ее в клетках, как и в контрольных образцах

Тканевые эквиваленты костной ткани на основе ММСК-ЖТ могут быть кандидатами для применения в регенеративной медицине, а исследования их применения на экспериментальных животных предоставят 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, обогащенная тромбоцитами плазма, остеогенная дифференцировка, зоны роста.

UDC 616.31:602.9:616-008.9:611.018.4

Microscopic Investigation of Compatibility of Samples Containing Multipotent Mesenchymal Stromal Cells of Additive Tissue in Experimental Conditions
Bambuliak A.V., Kuzniak N.B., Dmitrenko R.R., Tkachik S.V., Honcharenko V.A.

Abstract. *The purpose of the study was to investigate the biocompatibility of samples containing multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue to replace bone defects.*

Material and methods. The study was conducted at Bukovina State Medical University, Chernivtsi, Ukraine. Adipose tissue samples were obtained from the neck of 60 experimental animals (white Wistar rats). We selected 4 samples for the toxicological experiment, which allowed to establish the direct influence of factors in the contact of implantation material at the cellular level. Sample № 1 - Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue, which underwent osteogenic differentiation; № 2 - Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue with osteogenic differentiation with the addition of platelet-enriched blood plasma; № 3 - "Kolapan" with applied tissue culture of Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue cells, which underwent osteogenic differentiation; № 4 - "Kolapan" + Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue + platelet-enriched plasma. Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue were obtained by grinding adipose tissue of rats in 0.1% collagenase 1A [14]. The study of biocompatibility by cell culture *in vitro* was performed in accordance with the Working Instruction № 04/2013-VL. The cultures were investigated by the explantation method in a plasma clot in Karelian vials. In order to standardize the nature of growth, their zones were classified into compact, reticular and migrating cells of growing fibroblastic tissues.

To assess the probability of the obtained results of the study we used a variation-statistical method of analysis using Microsoft Excel. Statistical calculation of the results of clinical and laboratory studies was carried out according to conventional methods.

Results and discussion. Microscopic examination of the surface of samples with culture of fibroblasts showed their satisfactory adhesion on the tooth surface after 5 days of cultivation. In the study of sample № 1 (Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue, with osteogenic differentiation), it was noted that the structure of the cells acquired a rounded and oval shape, which indicated their destruction and damage. On the 5th day of observation, cells with numerical intussusception and processes were observed during visual examination of sample № 3 ("Kolapan", with applied culture of Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue). In the study of samples № 4 (Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue + platelet-enriched plasma + "Kolapan") on the 5th day of research, signs of growth were manifested by migration of fibroblastic elements that had a spindle-shaped and polygonal shape, with the formation of the primary zone due to strands. On the 7th day of cultivation in experimental samples № 2, № 3, № 4 there was the formation of three growth zones: compact - from cells of polygonal and spindle-shaped form; reticulate - from strands and bundles of cells that were located reticulate and areas of single migrating elements of

spindle-shaped. External characteristics and cell growth surface did not differ from control samples. On the 10th day of cultivation in the experimental samples, as well as in the control, the areas of compact and reticular growth zone and the zone of migrating fibroblasts were increased. At the same time, tissue-like growth of cells was observed. Visualization of compact and stack-like zones of the studied experimental samples revealed signs of the beginning of degenerative changes, which was characterized in the form of rounding of the shape and vacuolation of cells. This trend was most pronounced in samples № 2 and № 4.

Conclusion. Thus, tissue equivalents of bone tissue based on Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue can be candidates for use in regenerative medicine, and studies of their application in experimental animals will provide an opportunity to expand the understanding of the characteristics of Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue in order to optimize their further clinical application and implement new approaches in different areas of dentistry.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue, platelet-enriched plasma, osteogenic differentiation, growth zones.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 06.10.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування