

УДК 616.314.163-74:615.46:57.086.83:611-018.46:612.085.2

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ КЛОНИРОВАНИЯ КЛЕТОК СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА  
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ (IN VITRO) ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ ЭНДОГЕРМЕТИКОВ**

Астахова В.С., Панченко Л.М.

Лаборатория иммунологии Киевского НИИ ортопедии и травматологии

Современные методики и техники эндодонтических вмешательств позволяют максимально хорошо обработать стенки основных корневых каналов и обезвредить их содержимое [1,2,3]. Инструментальная обработка и пломбирование корневых каналов в пределах их анатомической длины с условием выполнения правил проведения соответствующих процедур, обуславливает минимальный контакт ирригантов, дезинфектантов и эндогерметиков с окружающими тканями [4]. Естественное или искусственно созданное широкое апикальное отверстие может обуславливать значительный контакт содержимого корневого канала с клеточными структурами периодонта и альвеолярной кости. Особенную актуальность вопрос о воздействии пломбировочного материала на клетки периодонта и губчатой кости приобретает в случаях избыточного выведения пломбировочных материалов за анатомические границы корневых каналов зубов [5,6]. Согласно требованиям, предъявляемым к эндогерметикам, они не должны угнетать репаративную регенерацию тканей, с которыми контактируют [7].

Попытки исследования цитотоксических свойств стоматологических материалов на культурах клеток тканей предпринимались ранее [8,9,10,11,12]. Большинство исследователей использовали культуры клеток эмбриона человека, что, во-первых, противоречит современным этическим представлениям, а во-вторых, мало информативно, так как с эмбриональными клетками стоматологические пломбировочные материалы не контактируют.

**Целью** настоящего исследования является изучение прямого влияния пломбировочных материалов для корневых каналов зубов на клетки стромы костного мозга человека (далее - КСКМ), а именно их способность к образованию колоний.

**Материалы и методы**

В губчатой костной ткани в настоящее время различают две линии клеток, которые имеют важное значение для морфогенеза и функционирования костной ткани: гемопоэтическую и стромальную [13]. Последняя дает начало ретикулярным, эндотелиальным клеткам сосудов, предшественникам фибробластов, хондроцитов и остеобластов [13, 14]. Фибробласты обеспечивают функцию регулятора дифференцировки на клеточном и тканевом уровне посредством синтеза ряда веществ, таких как тропоколлаген и другие компоненты межклеточного вещества (гликозамингликаны, фибронектин) [13, 14, 15]. Учитывая важную роль фибробластов, методики их культивирования широко используют для моделирования процессов, происходящих в соединительной и костной тканях [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,16]. Однако фибробласты представляют собой неоднородную клеточную популяцию и в зависимости от органной принадлежности различаются биохимическими характеристиками цитоплазмы, гетерогенностью содержимого лизосом [13, 14, 15]. В большинстве исследований для изучения цитотоксического влияния стоматологических материалов и медикаментов [8, 9, 10, 11, 12, 15, 16] используют фибробласты кожно-мышечной ткани эмбриона, которые по биохимическим характеристикам цитоплазмы, синтетической активности и чувствительности к регуляторным влияниям весьма отличаются от фибробластов костной ткани, а также одонтобластов, человека. Эти данные послужили основанием для проведения исследований с использованием стромальных клеток-предшественников костного мозга человека, полученной в

ходе ортопедических и стоматологических хирургических вмешательств. В качестве оптимальной избрана методика культивирования клеток-предшественников костного мозга человека (КСКМ), предложенная В.С. Астаховой [13]. Данная методика позволяет смоделировать условия, максимально приближенные к условиям организма *in situ*, обеспечивающие рост и размножение стромальных клеток-предшественников костного мозга. Унифицированные схемы посадки материала и его экспозиции позволяют получать и оценивать воспроизводимые и сравнимые результаты.

Исследования по культивированию стромальных фибробластов в присутствии пломбировочных материалов проводили в лаборатории иммунологии Института травматологии и ортопедии АМН Украины.

Для изучения прямого влияния эндогерметиков на КСКМ губчатой кости человека были отобраны такие материалы: эвгенаты «Форедент» (SPOFA, Словакия), «Эндометазон» (Septodont, Франция), «Эндофил» (Vevey, Швейцария), «U/P Root canal Sealer» (Sultan, США), смолосодержащие - «АН-plus» (Dentsply, США); стеклоиономерный "Endion" (VOCO, Германия); штифты гуттаперчевые №35 (Spident, США). В стерильных условиях опыта точная дозировка пломбировочного материала для пломбирования корней затруднена, поэтому количество силера в 1—3 мм<sup>3</sup> на чашку Петри оценивали как «малое», а количество 5-7 мм<sup>3</sup> - как «большое».

Всего проведен 61 опыт, в их числе: 27 – с эвгенатами, 12 – на основе смол, 10 – со стеклоиономерным цементом, 4 – с гуттаперчей, 8 – с комбинацией гуттаперчи с «Эндометазоном» и «АН-plus» (обобщенные результаты опытов иллюстрирует рис.1).

В стерильных условиях вымывали ядерные клетки костного мозга в среде 199 на магнитной мешалке. Затем с помощью камеры Горяева производили подсчет вымытых ядерных клеток из данного объема изучаемого образца спонгиозы. Объем последнего измеряли по объему вытесненной жидкости. Производили посадку костномозговых клеток в чашку Петри (диаметр дна 10 см) из расчета  $5 \cdot 10^3$  на 1 см<sup>2</sup> дна чашки. В качестве фидера использовали летально облученные дозой в 50—60 Грей клетки костного мозга кролика из расчета  $5 \cdot 10^5$  на 1 см<sup>2</sup> дна чашки. В чашку добавляли культуральную среду 199 с 20% содержанием сыворотки крови человека. В опытные чашки Петри перед посадкой клеток помещали по образцу одного из изучаемых пломбировочных материалов в «малом» и «большом» количествах в пределах одного опыта.

Чашки Петри – контрольные и опытные – помещали в эксикаторы с газовой смесью, содержащей 5% CO<sub>2</sub> в атмосферном воздухе, и культивировали в течение 12—14 суток в термостате при температуре 37<sup>0</sup>C без смены питательной среды. По истечении указанного срока выросшие колонии фиксировали этанолом, окрашивали по Романовскому-Гимза (рис.2). Подсчет колоний в чашках проводили с помощью микроскопа МБС-9.

Эффективность клонирования фибробластов (ЭКОФ) определяли по формуле:

$$\text{ЭКОФ} = N/M,$$

где N – количество выросших колоний, умноженное на 10<sup>5</sup>,

M – количество посаженных клеток.

### Результаты и их обсуждение

В ходе проведенных исследований были получены следующие результаты.

Присутствие гуттаперчи независимо от ее количества не угнетало рост колоний КСКМ. В присутствии испытуемого материала выросло в среднем  $113,5 \pm 17,36$  колонии, а в контроле –  $91,17 \pm 10,66$ . Соответственно ЭКОФ для гуттаперчи равна  $13,94 \pm 1,71$ , а для контроля –  $12,13 \pm 1,12$ ; вероятность равна 1,096, что менее 2,14, а, следовательно, статистически достоверной разницы между результатами опыта и контроля нет.

В опытах с пломбировочной массой с добавлением гидрокортизона на основе эвгенола были получены следующие данные. В присутствии "малого" количества "Эндометазона" в одном опыте выросло 269 колоний,

при этом колонии имели крупные размеры (3-5 мм в диаметре) и отличались многослойностью (рис. 2); в двух опытах с «Эндофилом» наблюдали рост единичных колоний, в остальных опытах образования колоний отмечено не было. В условиях контроля получили в среднем –  $228,72 \pm 62,9$  колонии. ЭКОФ соответственно равна в опыте 0; в контроле в среднем –  $34,61 \pm 7,62$ .



Рис. 1. Влияние некоторых эндогерметиков на колониобразующие свойства КСКМ (количество выросших колоний в опыте и контроле).

Из 12 опытов с эндогерметиком "АН+" только в одном в присутствии "малого" количества "АН+" наблюдали рост единичных фибробластов, а "большой" объем препарата полностью подавлял рост клеток. В контроле наблюдали образование в среднем  $126,42 \pm 19,38$  колоний фибробластов. Таким образом, ЭКОФ в опыте независимо от количества препарата равна 0, а в контроле в среднем –  $20,23 \pm 4,4$ .

В серии экспериментов по изучению влияния на КСКМ человека в присутствии «малого» количества стеклоиономерного эндогерметика "Endion" трижды наблюдали рост колоний (6 и 5 кластеров и единичные фибробласты); в то же время в контроле выросло в среднем  $159,13 \pm 23,9$  колонии. Соответственно, ЭКОФ равна в среднем в опытах 0 и  $29,69 \pm 4,13$  – в контроле.

Присутствие в опытных чашках «Эндометазона» с гуттаперчей в двух случаях обусловило рост единичных клеток, в двух – полностью подавило пролиферацию и дифференцировку стромальных клеток-предшественников костного мозга; в контроле же выросло в среднем  $61,3 \pm 21,39$  колоний. Соответственно, ЭКОФ для опытных чашек равна 0, для контрольных –  $9,36 \pm 3,36$ .

В одном из четырех опытов «АН-plus» с гуттаперчей наблюдали рост единичных клеток, не образующих колоний (ЭКОФ равна 0). В опытных чашках выросло в среднем  $76 \pm 18,49$  колоний, а ЭКОФ равна  $8,81 \pm 3,05$ .

Во всех опытах пасты на основе резорцин-формалиновой смеси и пломбирочного материала "U/P", независимо от количества, при непосредственном контакте с культурой фибробластов полностью подавляли

способность КСКМ к колониеобразованию. В контрольных чашках выросло в среднем  $74,5 \pm 18,2$  колонии; ЭКОФ в опыте равна нулю, а в контроле в среднем  $-10,22 \pm 1,77$ .

«Большое» количество пломбировочных материалов в культуральных чашках, кроме гуттаперчи, оказывало выраженное цитотоксическое действие и тем самым затрудняло деление исследуемых силеров на группы по их влиянию на рост и дифференцировку КСКМ.

В «малых» количествах по влиянию на КСКМ человека материалы для пломбирования корневых каналов зубов можно разделить на три условных группы:

-не угнетающие

-угнетающие

-аннигилирующие колониеобразующие свойства КСКМ человека (табл.1).

Табл. 1 Угнетение колониеобразующих свойств КСКМ под воздействием силеров

Исследуемые образцы	Среднее количество выросших колоний		ЭКОф		% угнетения
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	
Гуттаперча	$113,5 \pm 17,36$	$91,17 \pm 10,66$	$13,94 \pm 1,71$	$12,13 \pm 1,12$	+24,5%
Эндион	0 *2	$159,13 \pm 23,9$	0	$29,69 \pm 4,13$	«100%»
Эндометазон	0 *3	$228,72 \pm 62,9$	0	$34,61 \pm 7,62$	«100%»
АН +	0	$126,4 \pm 19,38$	0	$20,23 \pm 4,4$	100%
Форедент	0 **6	$195,5 \pm 38,56$	0	$35,98 \pm 6,44$	100%
Эметазон и гуттаперча	0 *2	$61,3 \pm 21,39$	0	$9,36 \pm 3,36$	«100%»
АН + и гуттаперча	0 *1	$76,0 \pm 18,49$	0	$8,81 \pm 3,05$	«100%»

Примечание: \* - единичные кластеры, количество случаев их роста;

\*\* - желирование питательной среды, количество случаев.

Если в контрольных и опытных чашках выросшие колонии стромальных фибробластов были одинаковыми по размеру и количеству, можно говорить об отсутствии цитотоксического эффекта на КСКМ исследуемых пломбировочных материалов. Если количество выросших колоний или их размеры в опытных чашках были меньше по сравнению с контрольными, можно сделать вывод о наличии частично угнетающего эффекта изучаемых силеров. В том случае, когда клетки полностью отсутствовали в опытных чашках, можно говорить о выраженном цитотоксическом эффекте и относить силеры к группе полностью угнетающих колониеобразующие свойства стромальных клеток-предшественников костного мозга.

К первой группе мы отнесли гуттаперчу, ко второй группе - силеры, в опытах с которыми наблюдали рост единичных колоний и кластеров или отдельных клеток - материалы на основе эвгенола с эндометазоном и стеклоиономерный цемент "Endion", в третью группу - пломбировочный материал на основе эпоксидных смол «АН-plus», материал на основе гваякола "U/P", а также материалы на основе резорцин-формалиновой смеси, в

т.ч. «Форедент». По степени возрастания токсичности исследованные материалы можно расположить следующим образом:

Гуттаперча < «Endion» < «Эндofil» < «Эндометазон» < «АН-plus» < «U/P» < «Форедент»

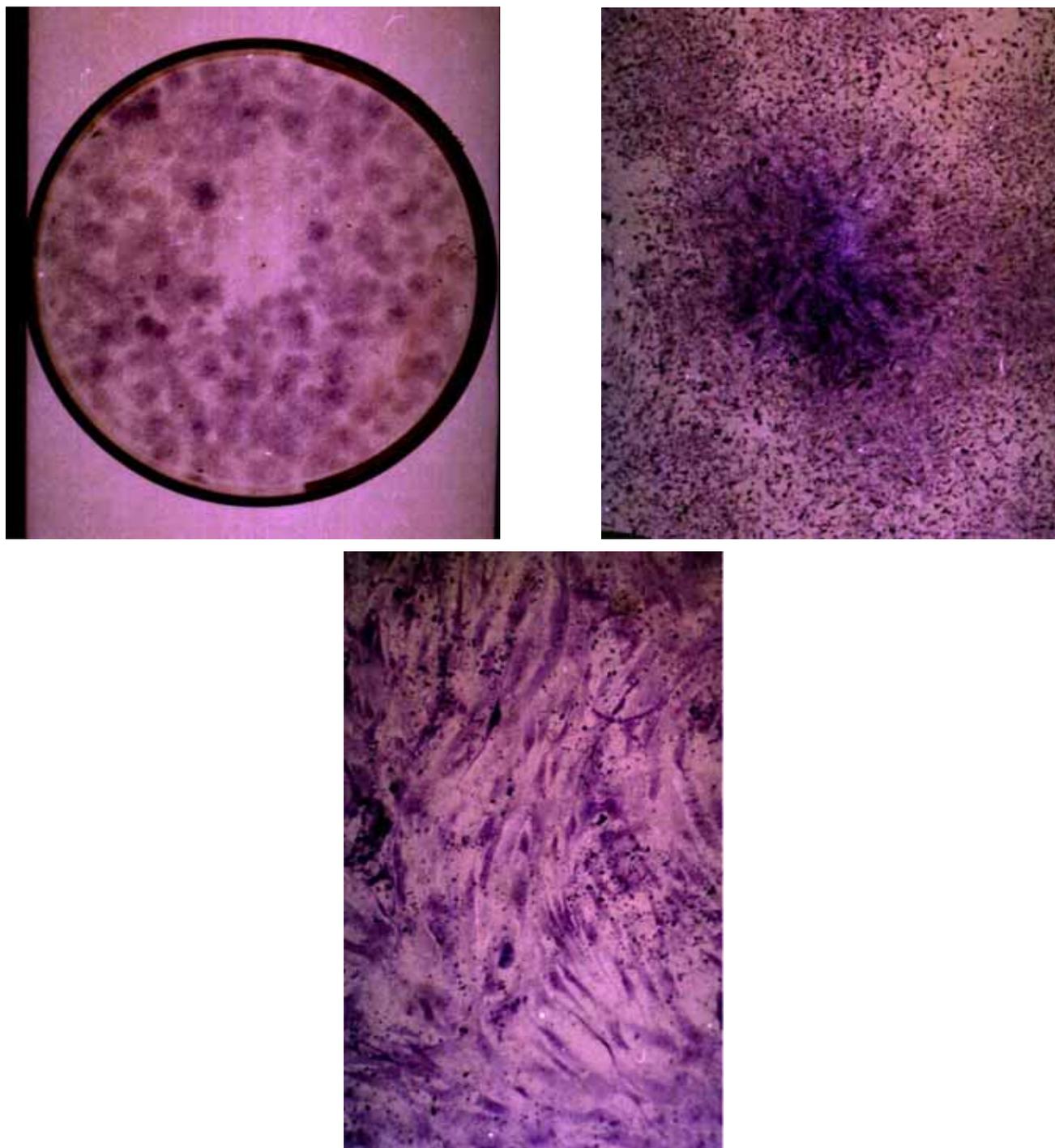


Рис. 2. Выросшие колонии КСКМ в опыте с эндометазоном:

А – общий вид чашки Петри (светлое пятно в центре – след от исследуемого силера);

Б – общий вид колонии КСКМ;

В – отдельные фибробласты в пределах одной колонии КСКМ.

Знание цитотоксических свойств силеров помогает при выборе эндогерметика, что особенно важно учитывать при проведении вмешательства у пациентов с хроническими заболеваниями, как стоматологическими, так и общими.

Разработка новых материалов, в т.ч. и стоматологических, требует тщательной проверки – токсикологической, гигиенической оценок, стандартизации и комплексного исследования на животных. Эти исследования длительные и дорогостоящие. Поэтому встает вопрос о методиках предварительного отбора материалов, позволяющих относительно быстро оценить токсичность последних. Если материал не оказывает выраженного цитотоксического действия, дальнейшие исследования с применением гематологических, аллергологических, патоморфологических и других методик являются целесообразными.

## Выводы

1. Методика изучения цитотоксичности пломбировочных материалов с использованием культуры КСКМ является достаточно простой, эффективной, позволяющей получать сопоставимые результаты вследствие стандартизации условий исследования. Ее можно рекомендовать в качестве тест-контроля цитотоксических свойств силеров, филлеров и других стоматологических пломбировочных материалов.
2. При выборе пломбировочного материала для заполнения корневых каналов зубов важно учитывать его цитотоксические свойства. Это позволит оптимизировать результаты эндодонтического лечения и предотвратить нежелательные осложнения.
3. Гуттаперчевые штифты являются практически индифферентными для КСКМ и не влияют на их колониеобразующие свойства.
4. В малых количествах «Эндометазон» и "Endion" частично угнетают рост и пролиферацию КСКМ, но сохраняющиеся при этом единичные клетки сохраняют способность к колониеобразованию, что позволяет отнести эти материалы к группе частично угнетающих.
5. Наиболее выраженным цитотоксическим эффектом обладают пломбировочные массы на основе резорцин-формалиновой смеси и гваякола.

## Список литературы

1. Боровский Е.В., Жохова Н.С. Эндодонтическое лечение.-М.-1997.-63 с.
2. Боровский Е.В. Клиническая эндодонтия.-М.-1999.-175 с.
3. Ingle J.I., Bakland L.K. Endodontics. – William & Wilkins, 1994.-946 p.
4. Иоффе Е. Зубоврачебные заметки// Научно-практический журнал «Новое в стоматологии».-1998, №1(61), с.51-54.
5. Григорьянц Л.А., Бадалян В.А., Тамазов М. Клиника, диагностика и лечение больных с выведенным пломбировочным материалом за пределы корня зуба. Клиническая стоматология, 2001, №1, с. 38-41.
6. L.Wagner, J.Trykowski. Histopatologiczna ocena zmian w tkankach kontaktujacych sie z wybranymi materialami do wypelnien kanalow korzeniowych (praca doswiadczalna).- Stomat. Wspolczesna; vol/3, nr.5, 1996, 398-402.
7. Надлежащая производственная практика лекарственных средств/Под ред. Н.А.Ляпунова, В.А.Загория, В.П.Георгиевского, Е.П.Безуглой.-К.: МОРИОН, 1999.-896с.
8. Кундзиня Р.С., Комнова З.Д., Воложин А.И. Реакция периодонта на заполнение канала разными пломбировочными материалами// Стоматология. - 1993. - №1. с.4-7.

9. Нападов М.А., Швецкая Б.Д., Харченко С.В., Сапожников А.А., Алиев З.А. Определение цитотоксического действия некоторых стоматологических материалов на культурах клеток // Стоматология. - 1973. - №2. - с.97-99.
10. Новохатский А.С. и соавт. Изучение цитотоксического действия пломбировочных материалов на клеточные культуры фибробластов эмбриона человека // Стоматология. - 1980. - т.59. - №2. - с.4-6.
11. Чупрунова И.Н. Определение цитотоксического действия некоторых антисептических средств и пломбировочных материалов в культуре клеток // Стоматология. - 1971. - №3. - с.20-23.
12. Яценко В.П., Галатенко Н.А., Пхакадзе Г.А., Липатова Т.Э. Метод количественного исследования роста фибробластических клеток в культуре ткани // Цитология и генетика. - 1984. - т.18. - №4. - с.260-263.
13. Астахова В.С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека.- К.: Феникс, 2000.- 176 с.:ил.
14. Бобро Л.И. Фибробласты и их значение в тканевых реакциях // Архив патологии. - 1990. - т.52. - №12. - с.65-68.
15. Глинских Н.П. Перспективы и принципы использования клеточных культур в заместительной терапии. Институт стоматологии, 2002, №4, с.22-23.
16. Корытная Р.Д. и соавт. Действие света гелий-неонового лазера на культуру фибробластов // Вопросы стоматологии. - 1980. - вып.2. - с.80-84.

#### **ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ КЛОНИРОВАНИЯ КЛЕТОК СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ (IN VITRO) ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ ЭНДОГЕРМЕТИКОВ**

**Астахова В.С., Панченко Л.М.**

**Лаборатория иммунологии Киевского НИИ ортопедии и травматологии**

В статье изложены результаты изучения непосредственного влияния материалов для пломбирования корневых каналов зубов на клетки стромы костного мозга методом клонирования.

*Ключевые слова:* метод культуры клеток, фибробласты, цитотоксическое влияние, материалы для пломбирования корневых каналов зубов.

#### **ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДИКИ КЛОНУВАННЯ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ (IN VITRO) ПРЯМОЇ ДІЇ ЕНДОГЕРМЕТИКІВ**

**Астахова В.С., Панченко Л.М.**

**Лабораторія імунології Київського НДІ ортопедії та травматології**

В статті викладено результати дослідження безпосереднього впливу матеріалів для пломбування корневих каналів зубів на клітини стромы кісткового мозку методом клонування.

*Ключові слова:* метод культури клітин, фібробласти, цитотоксичний вплив, матеріали для пломбування корневих каналів зубів.

#### **USING OF CLONING METHODS FOR DISCOVERING THE INFLUENCE OF ENDOGERMETICS ACTION ON STROMA CELLS (IN VITRO)**

**Astahova V.S., Panchenko L.M.**

**Immunology laboratory of Kiev institute of orthopedia and traumatology**

The results of investigation of cytotoxic influence of materials for root canals feeling by cells-cultivating method are described in the article.

*Key words:* cells-cultivating method, fibroblasts, cytotoxic fluence, materials for root canals feeling.