

**ЦИТОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОСТЕОБЛАСТІВ,
КУЛЬТИВОВАНИХ В ПРИСУТНОСТІ БІОМАТЕРІАЛІВ ІЗ РІЗНОЮ
ПОВЕРХНЕЮ**

*¹Потапчук А.М., ¹Русин В.В., ¹Шаркань Й.П., ¹Січка М.Ю., ²Гегедуш Ч.,
¹Криванич В.М.*

Резюме. В роботі наведені порівняльні результати дії зразків титану та цирконію з фазово-структурними змінами їх поверхні імпульсним Nd-YAG лазером на цитологічні особливості культивованих остеобластів. За досліджуваними показниками (оцінка проліферації та адгезії клітин до поверхні зразків, цитологічний та ультраструктурний стан клітин, відсутність патологічних мітозів) всі досліджувані зразки є біосумісними. Кращі показники характерні для цирконію і титану з модифікованою поверхнею.

Ключові слова. Остеобласт, біосумісність, імплантологія.

**CYTOLOGICAL PECULIARITIES OF OSTEOLASTS CULTIVATED IN
THE PRESENCE OF BIO-MATERIALS WITH DIFFERENT SURFACE**

*Potapchuk A.M., Rusyn V.V., Sharkany Y.P., Sichka M.U., Hegedus Cs.,
Kryvanych V.M.*

Summary. The investigation presents the comparative results of the influence of the samples of titan and zirconium with the phase – structural change of their surface by the impulse Nd – YAG laser on the cytological peculiarities of the cultivated osteoblasts. According to the investigated indices (the estimation of the proliferation and the adhesion of the cells to the surface of the samples, the cytological and ultra- structural state of the cells, the absence of pathological mitosis) all the samples under investigation are bio – compatible. Better results are characteristic for the zirconium and titan with the modified surface.

Key – words: osteoblast, bio-compatibility, implantology.

УДК 616.716.843

¹Державний вищий навчальний заклад «Ужгородський національний університет», кафедра стоматології факультету післядипломної освіти

(зав. проф. Потапчук А.М.)

²Дебреценський університет, стоматологічний факультет (Угорщина)

Вступ.

Методи культивування клітин широко використовуються для первинного скринінгу біоматеріалів, які в якості імплантатів застосовуються в стоматології та ортопедії. Перевагою цих методів є те, що дослідження біоматеріалів може бути проведено у короткий термін. Інформація, яку одержують при цьому методі, дозволяє зробити висновок про наявність чи відсутність у біоматеріалів цитотоксичності, про їх біосумісність та адгезивні якості, а також дає можливість вивчити динаміку росту клітин у культурах зі зразками, дослідити їх проліферативну активність культивованих клітин та зробити висновок про збереження клітинами фенотипу [1, 7, 11].

Мета дослідження - вивчити дію різних біоматеріалів (з покриттям та без них) на цитологічні особливості культивованих остеобластів.

Матеріал та методи.

У культурі остеобластів (4 денних щурів) досліджували 6 зразків біоматеріалів у вигляді дисків з діаметром 7 мм і висотою 2 мм, які відрізнялись матеріалом та структурою поверхні: 1) зразок № 1 – чиста поверхня титану; 2) зразок № 1 + піскоструйна поверхня + обробка лазером (циліндрична оптика), 700 W; 3) зразок № 1 + (ТКФ) + піскоструйна поверхня + обробка лазером (циліндрична оптика), 900 W; 4) зразок № 1 + (ГАП) + піскоструйна поверхня + обробка лазером (циліндрична оптика), 700 W; 5) цирконій чистий; 6) цирконій + (скрайбірування) + обробка лазером (циліндрична оптика), 700 W.

Стерилізовані зразки були розміщені на покривні скельцях (24x24 мм) у чашках Петрі (діаметром 30 мм), куди висівали остеобласти для культивування.

Як контроль використовували культуру клітин на скельцях без зразків.

У роботі досліджували:

- проліферативну активність культивованих клітин (загальна кількість клітин на зразках, відсоток загиблих клітин за термінами дослідження);
- адгезію культивованих клітин до поверхні зразків за кількістю прикріплених клітин у різні терміни культивування;
- цитологічний стан та ультраструктурну організацію клітин, наявність мітозів, збереження клітинами остеобластичного фенотипу.

При роботі з тваринами (для одержання клітин) додержувались правил гуманного відношення до експериментальних тварин [9]. Для культивування використовували остеобласти, вилучені із кісток черепа 4-х добових новонароджених щурят [13]. Культивували остеобласти за методом моношарової культури у живильному середовищі (20 мл середовища DMEM (Sigma), 2 мл 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma), 80 U/мол пеніциліну, 100мг/мол стрептоміцину) в умовах 95 % вологості в атмосфері 5 % CO₂ впродовж 1, 3 та 5 діб при 37° С.

Вилучені клітини у кількості 10000 (для дослідження проліферації клітин на зразках) та 60000/см² (для аналізу адгезії клітин до поверхні зразків) були висіяні безпосередньо на досліджувані металеві зразки, котрі розміщували на покривних скельцях у чашках Петрі.

Для дослідження проліферативної активності клітин культивовані клітини знімали із досліджуваних зразків 0,25% розчином трипсин/версен через 1, 3 та 5 діб. Клітини у суспензії фарбували трипановим синім і підраховували загальну кількість клітин та загиблі клітини у камері Горяєва за спеціальною формулою [2].

Для оцінки *адгезії клітин* клітини на зразках витримували у живильному середовищі впродовж – 15, 25 та 35 хв, після цього клітини знімали зі зразків розчином трипсин/версен, фарбували клітини у суспензії кристалвіолетом і підраховували їх у камері Горяєва за формулою [2].

Для цитологічного дослідження клітин (форма клітин, цілісність клітинної мембрани, структура ядер і цитоплазми (вакуолізація цитоплазми), деструкція клітин) клітини на скельцях фарбували азур-еозином за

Романовським. Досліджували клітини у світловому мікроскопі MICROS. Фотографували за допомогою цифрової фотокамери Canon EOS -300D.

Ультраструктурну організацію клітин вивчали електронно-мікроскопічним методом. Клітини, після спеціальної підготовки, заключали у суміш епон–аралдиту. Ультратонкі зрізи контрастували за Reynolds E. S. і аналізували у мікроскопі ЭВМ–100БР.

Отримані кількісні дані були оброблені методом варіаційної статистики з використанням прикладного пакета Statistica 5.11 for Windows, а рівень вірогідності прийнятий 95%.

Результати досліджень та їх обговорення

Визначення проліферативної активності культивованих клітин на зразках. При дослідженні клітин, знятих зі зразків біоматеріалів, встановлено, що їх кількість збільшувалась за термінами культивування. Це свідчить про те, що клітини прикріплялись до зразків, були життєздатними і активно ділились. Проте темпи проліферації клітин на зразках відрізнялись, на що вказує різна кількість клітин за термінами дослідження. Кількісні дані, що характеризують проліферативну активність культивованих клітин, представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Кількість клітин, знятих зі зразків на різні терміни

Серії експериментів	1 доба		3 доба		5 доба	
	Загальна кількість клітин	Мертві клітини	Загальна кількість клітин	Мертві клітини	Загальна кількість клітин	Мертві клітини
Дослід № 1	134,5 ± 9,7	10,8 ± 1,1 7,5 %	215,7 ± 11,9 P5 < 0,05	18,8 ± 1,9 8,7 %	275,5 ± 12,8 P5 < 0,05	27,7 ± 3,1 9,1 %
Дослід № 2	175,4 ± 11,2 P1 > 0,05	12,5 ± 1,2 7,1 %	285,6 ± 12,1 P1 < 0,05 P5 < 0,05	26,8 ± 2,3 9,4 %	369,9 ± 11,3 P1 < 0,05 P5 < 0,05	36,6 ± 2,9 9,9 %
Дослід № 3	189,6 ± 11,6 P1 < 0,05	11,4 ± 0,96 6,0 %	342,6 ± 13,3 P1 < 0,05 P5 < 0,05	27,1 ± 2,5 7,9 %	430,4 ± 14,7 P1 < 0,01 P5 < 0,05	36,1 ± 3,7 8,4 %
Дослід № 4	193,4 ± 12,3 P1 > 0,05	10,6 ± 0,87 5,5 %	324,6 ± 9,9 P1 < 0,05	28,6 ± 2,2 8,8 %	398,7 ± 11,9	35,9 ± 2,8 9,0 %

	P2>0,05		P2> 0,05 P5< 0,05		P1< 0,05 P2> 0,05 P5< 0,05	
Дослід № 5	226,7 ± 13,5 P1< 0,05	10,9 ± 0,98 4,8%	407,6 ± 14,6 P1< 0,05 P3< 0,05 P5< 0,05	22,8 ± 1,9 5,6 %	532,4 ± 21,5 P1< 0,01 P3< 0,05 P5< 0,05	35,7 ± 3,2 6,7 %
Дослід № 6	257,5 ± 14,4 P1< 0,05 P3<0,05 P4>0,05	13,1 ± 1,2 5,1 %	498,9 ± 15,2 P1< 0,05 P3< 0,01 P4< 0,05 P5< 0,01	32,4 ± 2,1 6,5 %	629,4±23,7 P1< 0,01 P3< 0,01 P4< 0,05 P5< 0,05	45,3 ± 4,6 7,2 %

P1 – статистичні відмінності у кількості клітин на зразках від показника зразка № 1;
P2 – статистичні відмінності у кількості клітин на зразках № 3 і № 4;
P3 - статистичні відмінності у кількості клітин на зразку № 3 від зразків № 5 та № 6;
P4 - статистичні відмінності кількості клітин між зразками № 5 та № 6;
P5 - статистичні відмінності кількості клітин на зразках від показників на першу добу

Як свідчать дані таблиці, щодо показників кількості клітин на зразках за термінами дослідження, проліферативна активність культивованих остеобластів була високою на зразках № 5 та 6. Низькою (на всі терміни дослідження) проліферативна активність клітин була на зразку № 1. Одержані дані свідчать, що проліферація клітин на зразках, залежить від матеріалу зразка та топографії його поверхні. Кількість загиблих клітин статистично не відрізнялась між зразками і була у межах – від 4,8 % на першу добу і до 9,9 % - на п'яту добу. Ці показники не перевищують числа загиблих клітин, характерних для первинних культур.

Визначення адгезії культивованих остеобластів до поверхні досліджуваних зразків. Кількість клітин, знятих зі зразків за термінами їх прикріплення, представлені у таблиці 2.

Як свідчать дані таблиці, найменш виражена адгезія клітин до поверхні зразків (за даними кількості клітин) була зафіксована для зразків за номером 1 та 2 на всі досліджувані терміни, а вірогідно сама висока – для зразків № 5 та № 6. Кількість клітин на зразках № 2 - № 6 (через 15 хв) була вірогідно вищою за показники зразка № 1, відповідно у 1,59; 2,23; 2,03; 3,13 та 3,52 рази.

Кількість клітин, знятих зі зразків на різні терміни

Серії експериментів	15 хв	25 хв	35 хв
	Кількість клітин	Кількість клітин	Кількість клітин
Дослід № 1	35,7 ± 3,9	49,4 ± 4,2 P5 > 0,05	68,9 ± 7,8 P5 < 0,01
Дослід № 2	56,8 ± 4,7 P1 < 0,05	68,3 ± 5,1 P1 < 0,05 P5 > 0,05	125,4 ± 8,2 P1 < 0,01 P5 < 0,05
Дослід № 3	79,5 ± 5,9 P1 < 0,05	109,8 ± 8,4 P1 < 0,01 P5 > 0,05	187,5 ± 11,2 P1 < 0,01 P5 < 0,05
Дослід № 4	72,4 ± 6,1 P1 < 0,05 P2 > 0,05	105,3 ± 8,1 P1 < 0,01 P2 > 0,05 P5 < 0,05	166,7 ± 9,5 P < 0,01 P2 > 0,01 P5 < 0,05
Дослід № 5	111,7 ± 7,4 P1 < 0,05 P3 < 0,05	145,7 ± 8,5 P1 < 0,01 P3 < 0,05 P5 > 0,05	305,75 ± 12,5 P1 < 0,001 P3 < 0,01 P5 < 0,001
Дослід № 6	125,8 ± 11,3 P1 < 0,05 P1 < 0,05 P3 < 0,05 P4 > 0,05	188,6 ± 10,4 P1 < 0,001 P3 < 0,01 P4 > 0,05 P5 < 0,05	381,8 ± 13,7 P1 < 0,01 P3 < 0,001 P4 < 0,05 P2 < 0,001

P1 – статистичні відмінності у кількості клітин на зразках від показника № 1;

P2 – статистичні відмінності у кількості клітин на зразках № 3 і № 4;

P3 – статистичні відмінності у кількості клітин на зразку № 3 від № 5 та № 6;

P4 – статистичні відмінності кількості клітин між зразками № 5 та № 6;

P5 – статистичні відмінності кількості клітин на зразках від показників на першу добу.

Необхідно відмітити, що кількість клітин на зразку № 2 не була високою, проте вона вірогідно відрізнялася від зразка № 1, що свідчить про позитивний вплив на адгезію клітин модифікації поверхні. Подібний ефект відмічається і на зразках № 5 та № 6, де більш високі показники кількості клітин зафіксовано також на модифікованій поверхні. Вірогідні відмінності у кількості клітин на зразках № 1 та № 6 свідчать про виражено високі адгезивні якості цирконію при порівнянні з матеріалом зразка № 1.

Через 35 хв. кількість клітин на всіх зразках збільшилась і була вірогідно вищою для всіх зразків при порівнянні з 15-хвилинним терміном культивування у 1,93; 2,2; 2,36; 2,3; 2,74; 3,03 рази, відповідно до номера

зразка (№ 1 - № 6). Проте і на даний період спостерігались встановлені раніше залежності, тобто найменша кількість клітин спостерігалась на зразках № 1 та № 2, а найвища – на зразках № 5 та № 6.

На даний термін дослідження виявлялась встановлена раніше залежність вираженості адгезії клітин від структури поверхні та якостей матеріалу. Адгезія клітин була вищою саме на зразках із модифікованою поверхнею (№ 2 – у 1,24 рази, при порівнянні з № 1 та № 6 – у 1,25 рази, при порівнянні зі зразком № 5), а також на зразках із цирконію (зразок № 5) при порівнянні із матеріалом зразка № 1. Аналіз зразків № 3 та № 4 свідчить про незначну перевагу покриття з ТКФ над використаним покриттям з ГАП.

Цитологічні та ультраструктурні дослідження клітин у культурах зі зразками (5 доба.) При порівняльному цитологічному дослідженні стану культивованих клітин у культурах зі зразками, а також у контрольній культурі (без зразків) відмінностей у топографії розташування клітин на скельцях, фенотипі кліток та структурній організації не було виявлено. Клітини на скельцях формували нашарування різної щільності (рис. 1 А, Б, В, Г, Д, Е). Вони мали округлу та овальну форму, а на периферії клітини були більш витягнуті. Контури клітин були чіткими. Клітини мали базофільні, переважно округлі ядра, у більшості клітин вони розташовувались ексцентрично, що було характерно для клітин остеобластичного диферону. Хроматин ядра у переважній більшості клітин був пухким. У ділянках із незначною щільністю клітин, виявлялись клітини з різними фігурами мітозу.

При електронно-мікроскопічному аналізі встановлено, що ультраструктура клітин, знятих зі скелець із досліджуваними зразками (№ 1 - № 6) та контролю була подібною. Переважали клітини остеобластичного диферону, серед яких виявлялись преостеобласти і остеобласти (рис. 3 А, Б).

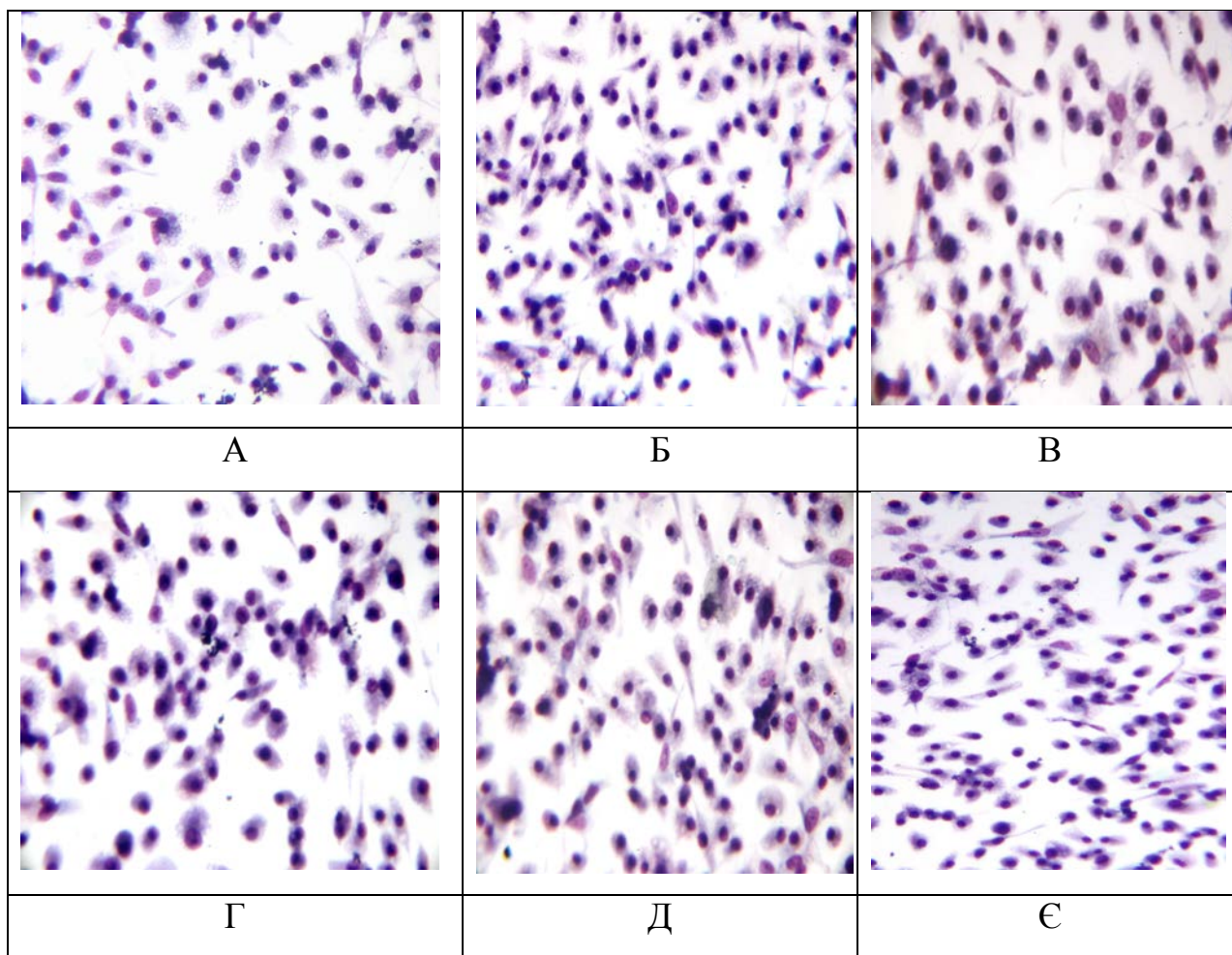
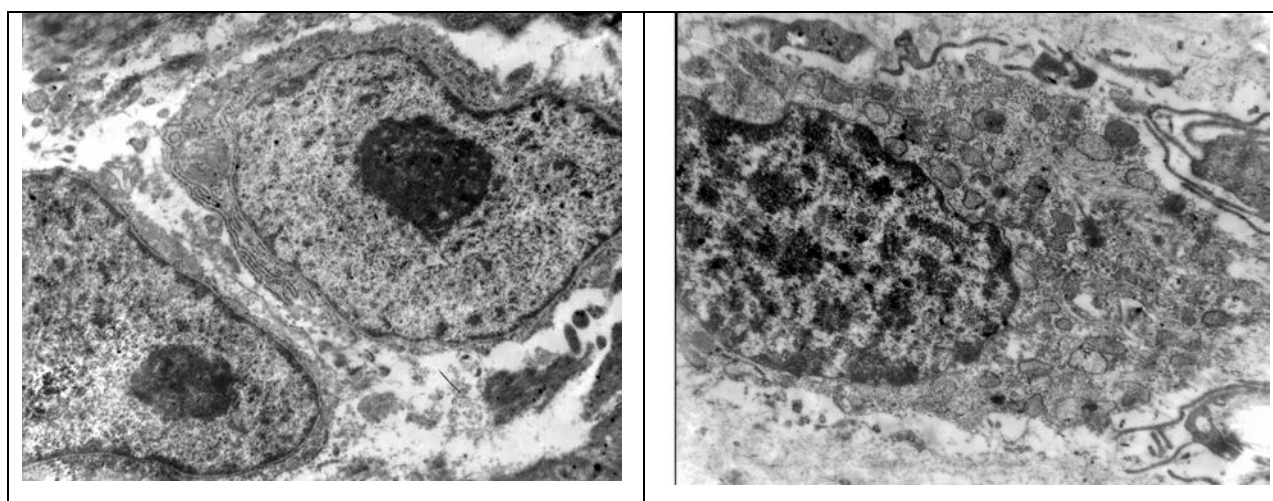


Рис. 1. Культура остеобластів (5 доба): А – зі зразком № 1; Б - зі зразком № 2; В - зі зразком № 3; Г - зі зразком № 4; Д - зі зразком № 5; Є - зі зразком № 6.



А

Б

Рис. 3. А). Преостеобласти з крупними ядрами з еухроматином. Вузька цитоплазма з поодинокими канальцями гранулярної ендоплазматичної сітки. Контрастовано за Рейнолдсом (Зразок № 2). Зб. 13500. Б). Остеобласт. Цитоплазма зі значною щільністю везикул із гомогенним вмістом. Поодинокі

рибосоми та скупчення полісом. Цитоплазматичні відростки (Зразок № 6). Контрастовано за Рейнольдсом Зб. 13100.

Це свідчить про те, що зразки біоматеріалів не порушують диференціювання клітин. Клітини у культурах зберігають остеобластичний фенотип. Остеобласти мали крупні розміри. Ядерно-цитоплазматичні відношення були низькими, за рахунок збільшення території цитоплазми. Ядра клітин розташовувалися ексцентрично. Вони були виповнені гетеро- та еухроматином, який рівномірно розташовувався по поверхні ядра. У ядерній мембрані відмічена значна кількість пор, що свідчить про активний ядерно-цитоплазматичний транспорт. У цитоплазмі виявлялись численні, розсіяні по цитоплазмі, везикули, які можна віднести до комплексу Гольджі. Везикули були виповнені гомогенним вмістом. Між везикулами розташовувались поодинокі рибосоми та скупчення полісом. У цитоплазмі деяких остеобластів визначалась добре розвинута гранулярна ЕПС, представлена численними канальцями, котрі на ділянках розширялись у цистерни.

Отже, на 5-у добу культивовані із досліджуваними зразками (№ 1 -№ 6) клітини зберігали остеобластичний фенотип, були метаболічно активні про що свідчать особливості організації ядра та цитоплазми.

Вірогідно вищі показники проліферативної активності та адгезії клітин до поверхні зразків були характерні для зразків з модифікованою поверхнею. На вказані характеристики впливає і матеріал зразків. Одержані у даному дослідженні результати співпадають із даними літератури щодо впливу на проліферацію клітин та адгезивні якості біоматеріалів природи матеріалу та структури його поверхні [6, 8, 14]. Топографія поверхні відіграє домінуючу роль у формуванні безпосереднього зв'язку клітин із поверхнею біоматеріалу [5]. Експеримент з культурою остеобластів людини було виконано при дослідженні титанових зразків, поверхня котрих була модифікована за рахунок створення шорсткості шляхом нанесення частинок титану розміром 45-63 мкм та 63-90 мкм. [15]. Адгезія клітин спостерігалася на всіх титанових зразках. Проте темпи приросту клітин на полірованій поверхні титану (після

24 годин культивування) були вірогідно меншими за показники шорсткуватого титану. Найвищі показники проліферації клітин були відмічені на зразку титану з частинками розміром 63-90 мкм. Одержані дані свідчать, що модифікація поверхні титану зі створенням шорсткості сприяє не тільки адгезії клітин, але й їх вираженій проліферації.

При порівнянні титану з цирконієм (як у виконаному дослідженні, так і за даними літератури [10]), показники проліферації клітин та адгезії були більш виражені саме у цирконію. Біоактивні керамічні матеріали – трикальційфосфат та гідроксилапатит також перевищують титан за біосумісністю. Клітини сприймають ці біоматеріали як природну матрицю і тому проліферація клітин та адгезія на цих матеріалах виражена в більшій мірі, ніж на титані [4, 13, 16]. У виконаному дослідженні були одержані подібні результати - показники адгезії клітин були вищими на зразках із покриттям із ГАП та ТКФ, при порівнянні зі зразком № 1 – без покриття.

Висновок: За досліджуваними показниками - оцінка проліферації та адгезії клітин до поверхні зразків біоматеріалів, цитологічний та ультраструктурний стан клітин, кількість мертвих клітин у культурах, відсутність патологічних мітозів, всі досліджені зразки є біосумісними і не чинять токсичної дії. Зразки біоматеріалів характеризуються високими адгезивними якостями. Проте при порівнянні зразків за матеріалом (зразок № 1 та № 6) кращі показники характерні для цирконію, а за структурою поверхні - зразки з модифікованою поверхнею.

Використана література:

1. Малишкіна С.В. Біосумісність та цитотоксичність композиту на основі полілактиту / С.В. Малишкіна // Український морфологічний альманах .-2006.-№1.-С. 47-50.
2. Методические рекомендации по получению, культивированию и использованию в научных и производственных ветеринарных лабораториях первичных, перививаемых и диплоидных культур клеток живого происхождения. М. – 1978.-30 с.

3. Методические рекомендации по криоконсервированию и цитологическому контролю качества культур клеток и фрагментов ткани. - Харьков: НИИ экспериментальной ветеринарии. - 1981. - 27 с.
4. Шаркань Й.П. Модифікації поверхні титанових імплантатів високоінтенсивними концентрованими джерелами нагріву / Шаркань Й.П., Січка М.Ю., Потапчук А.М. [та ін.] // Стоматологія Пародонтологія Остеологія. - 2007. - № 4. - С.79-84.
5. Albrektsson T. Experimental studies on oxidized implants. A histomorphometrical and biomechanical analysis / T. Albrektsson, C. Johansson, A. Lundgren [et al] // Appl. Osseointegration Res. – 2000. - № 1. – P. 21 – 24.
6. Biasotto M. Porous titanium obtained by a new powder metallurgy technique. Preliminary results of human osteoblast adhesion on surface polished substrates / M. Biasotto, R. Ricceri, N. Scuor [et al.] // J. Appl. Biomater. Biomech. -2003. -№1. -P.172-177.
7. Bordji K. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5 Fealloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts / K.Bordji , J.Jouzeau, D.Mainard [et al] // Biomaterials.-1996.-Vol.17.-P.929-940.
8. Eisenbarth E. Interactions between cells and titanium surfaces / E. Eisenbarth, D. Velten, K. Schenk-Meuser [et al.] // Biomolecular Eng. -2002. - №19. -P.243-249.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.-Council of Europe. Strasburg.1986.-N 123.- 52 p.
10. Hao L. Osteoblast cell adhesion on laser modified zirconia based bioceramic/ Lawrence J., Chain K.// J. Mater Sci Med .-2005.-Vol.16.-P. 719-726.
11. Johnson H.J. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro II. Objective methods of toxicity / H.J. Johnson, S. J. Northup, P.A. Seagraves // J. Biomed. Med. Res. – 1995. – Vol. 19. P. 489 – 6111.
12. Lee T.M. Attachment and proliferation of neonatal rat calvarial osteoblasts on Ti6Al14V: effect of surface chemistries of the alloy / Lee T.M., Chang E., Yang C // Biomaterials.-2004.-Vol. 25.-P. 23-32.
13. Moronia A. Histomorphometry of hydroxyapatite coated and uncoated porous titanium bone implants / A. Moronia, V.L. Caja, E.L. Egger [et al] // Biomaterials. – 1994. - Vol. 15. - № 11. – P. 926 – 930.
14. Müller U. Do human osteoblasts grow into open-porous titanium? / U. Müller, T. Imwinkelried, M. Horst [et al] // European Cells and Materials. – 2006. – Vol. 11. – P. 8 – 15.
15. Mustafa K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular

alveolar bone / K. Mustafa, J. Wroblewski, B. S. Lopez [et al] // *Clinical Oral Implants Research*. – 2009. – Vol. 12. – P. 515 – 525.

16. Ramires P.A. The influence of titania/hydroxiapatite composite coating on in vitro osteoblasts behaviour / P.A. Ramires, A.M. Romio, F. Consentino, E. Milella // *Biomaterials*. – 2001. – Vol. 22. – P. 1467 – 1474.

Робота виконана в рамках в рамках держбюджетної науково-дослідної роботи (№ державної реєстрації 0105007690, шифр 620) та договору про співпрацю між Ужгородським національним університетом та Дебреценським медичним університетом (Угорщина).

Довідка про авторів

Потапчук Анатолій Мефодієвич, д.мед.н., проф., зав. кафедри стоматології ФПО УжНУ;

Русин Віталій Васильович – аспірант кафедри стоматології ФПО УжНУ;

Шаркань Йосип Перович – к.ф.-м.н., доцент кафедри стоматології ФПО УжНУ;

Січка Михайло Юрійович – к.ф.-м.н., доцент кафедри твердотільної електроніки УжНУ;

Гегедуш Чобо – д.мед.н., проф., декан стоматологічного факультету Дебреценського університету (Угорщина);

Криванич Володимир Миколайович – асистент кафедри стоматології ФПО УжНУ.