

Klinika za bolesti zuba  
Stomatološkog fakulteta, Beograd  
upravnik Klinike prof. dr N. Mađanović

## Metod kulture tkiva i stomatološka istraživanja\* \*\*

D. KUBUROVIĆ, D. KEZELE, O. KARADŽOVA, D. MARKOVIĆ, S. SEDLECKI

Praćenje razvoja ćelija, tkiva i organa u raznim fazama embriogeneze, proučavanje etiopatogeneze karijesa, paradentopatija, miloliza, raznih malformacija zuba i vilica i čitavog niza obolenja sa još nerazjašnjenom etiologijom predstavlja osnovni zadatak u naučno istraživačkom radu stomatologa.

Preduslov za uspeh terapijskih zahvata je odsustvo citotoksičnosti lekova, odnosno materijala koji se koriste u restauraciji karijesom oštećenih zuba i za trajnu opturaciju kanala korena.

Na osnovu hemijskog sastava može se zaključiti o gore pomenutim osobinama određenih supstanci, ali prema savremenim kriterijumima neophodno ih je i eksperimentalno proveriti.

Mogućnosti korišćenja humanog materijala u eksperimentalne svrhe su ograničene u prvom redu iz etičkih razloga. U svrhe ispitivanja in vivo kao eksperimentalne životinje se koriste majmuni, psi i pacovi zbog sličnosti građe organa i načina reagovanja tkiva.

Izolovane ćelije ili organi u razvoju za vreme embrionalnog života i njihovo dalje odgajanje u in vitro uslovima se sve više koriste, u cilju praćenja i proučavanja reakcija, koje nastaju u toku razvoja ili pod egzogenim uticajem raznih ispitivanih materijala.

Proučavanje reakcija na nivou ćelija pruža iscrpne informacije o histodiferencijaciji, mitotičkoj aktivnosti, metabolizmu ćelija, njihovoj sekretornoj funkciji i dr. Ove informacije na nivou ćelija nisu samo kvalitativne već i kvantitativne.

Za eksperimentalna istraživanja u in vitro sistemu su najranije korišćeni fibroblasti L-929 kao najrasprostranjenija, a istovremeno nisko diferencirana ćelija živih organizama (Berliner i sar. 1967, Ruch i sar. 1970, Čuprinova 1971, Leirskar i Helgeland 1972). Materijali korišćeni u ispitivanju bili su steroidi (Berliner i sar. 1967, Ruch i sar. 1970), razni antiseptici koji se koriste u svakodnevnom kliničkom radu (Čuprinova 1971), ili materijali koji se koriste za trajnu opturaciju kanala i za

\* Rad je finansirala Zajednica medicinskih naučnih ustanova SR Srbije.

\*\* Ovaj je rad pročitao na Simpoziju stomatologa Slavonije i Baranje, u Osijeku, jeseni 1973.

restauraciju izgubljenih zubnih tkiva (Čuprinova 1971, Leirskar i Helgeland 1972).

Osim fibroblasta su korišćene i oralne epitelijalne ćelije za određivanje njihove mitotičke aktivnosti (Harald Löe i sar. 1972), humane epitelijalne ćelije NCTC 2544 (Helgeland i Lairsker 1972) kao i Hela ćelije (Spangberg) u ispitivanju raznih dentalnih materijala. Reagovanje ćelija na primenjen materijal određivano je brojanjem ćelija, njihovom mitotičkom frekvencijom, proizvodnjom dezoksiribonukleinske kiseline, ili utroškom kiseonika za vreme kultivisanja.

Sa stomatološkog aspekta najinteresantnija su kultivisanja glednog organa u razvoju i analiza reakcija visokodiferenciranih ćelija, adamantoblasta i odontoblasta na materijale koji se primenjuju u ovoj grani stomatologije.

Na kulturi zubnih zametaka u proučavanju diferencijacije ćelija u toku mineralizacije tkiva je radilo više autora (Glasstone, Gerstner, Butcher, Hay, Koen).

Zubni zameci mišjih embriona su se pokazali kao veoma pogodni za ova istraživanja jer uzeti u različitim fazama embriogeneze omogućuju praćenje reakcija na nivou adamantoblasta, odontoblasta i ćelija zubne papile (Karcher-Đuričić i Muller 1970, Ruch i Đuričić 1969, Karadžov, Kezele, Kuburović, Sedlecki, Marković 1973).

U našem istraživačkom radu vrše se ispitivanja u in vitro sistemu na kulturi fibroblasta i zamecima zuba mišjih embriona kao i novorođenih miševa.

## METOD RADA

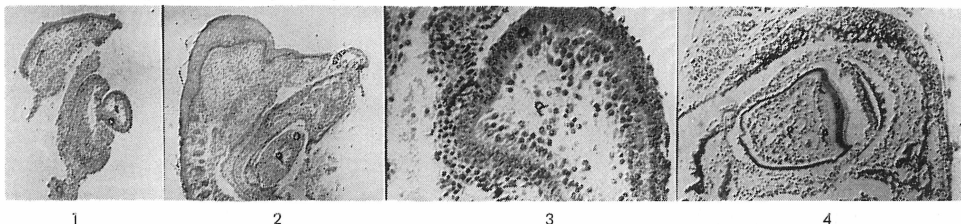
Kultura fibroblasta: Embrioni psa, miša ili pacova se izvade pod sterilnim uslovima i ispiraju u medijumu bez dodatnog seruma. Po ispiranju embrioni se maksimalno isitne-ispisiraju i tako dobijena masa se stavlja u 0,2% rastvor trispsina 15—20 min, na sobnoj temperaturi. Posle resuspenzije, tkivo se u epruvetama centrifuguje 5—6 min, na 500 obrtaja, gde se fibroblasti istalože na dno epruvete. U medijumu kome je dodat serum, kultivisanje se vrši na temperaturi 37°C uz stalno pritanje 95% kiseonika i 5% ugljen-dioksida. Tri, odnosno šest dana po trajanju eksperimenta odlije se medijum, a fibroblasti ostaju na dnu suda u kome je vršeno kultivisanje. Ukoliko je sud staklen, dno se iseče i koristi kao mikroskopska pločica, a na njoj se vrši fiksacija bouinom. Bojenje je hematoksilin eozinom ili po Azan u a ispitivanje pomoću svetlosne mikroskopije.

Kultura zubnih zametaka: Za ova istraživanja su korišćeni beli miševi, tako što je mišicama raden carski rez 20—21 dana posle oplodjenja. Fetusi su izolovani, izvađena mandibula, sečena po simfizi, a zatim su načinjeni otsecci u regionima zubnih zametaka, dijametra 1—2 mm. Ceo postupak je izvođen pod lupom. Odsecci mandibule su stavljeni u posebne sudove slične petri šoljama, u kojima se nalazi medijum. Za istraživanja se koristi veći broj podloga (Parker 199, Eagle i dr.). U radu je korišćena podloga Parker 199, uz dodatak krvnog seruma. Kultivisanje zubnih zametaka vršeno je u eksikatorima u termostatu na 37°, uz dodatak 95% kiseonika i 5% ugljen-dioksida. Posle tri, odnosno šest dana odsecci su fiksirani u bouinu. U isti

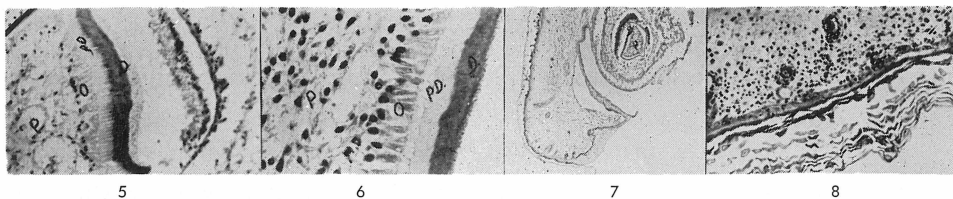
fiksativ stavljeni su i kontrolirani odsecci, koji nisu kultivisani. Po fiksaciji koja je trajala par dana, odsecci su uklapani u parafin, sečeni prosečno debljine 6 mikrona, bojeni hematoksilineozinom ili po Azan u i ispitivani svetlosnom mikroskopijom.

## REZULTATI:

Slike 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.



Sl. 1. Transverzalni presek začetka donjeg sekutića miša 21. dana embriogeneze sa delovima kože. — Sl. 2. Transverzalni presek začetka donjeg prvog molara miša 21. dana embriogeneze. — Sl. 3. Prethodni preparat na većem uveličanju. — Sl. 4. Transverzalni presek donjeg sekutića miša uzetog 21. dana embriogeneze i kultivisan šest dana u medijumu Parker 199.



Sl. 5. Detalj iz prethodnog preparata na većem uveličanju. — Sl. 6. Prethodni preparat, još veće uveličanje. — Sl. 7. Transverzalni presek začetka donjeg sekutića miša i delovi kože uzeti 21. dana embriogeneze i kultivisani 6 dana u parkeru 199. — Sl. 8. Detalj iz prethodnog preparata u predelu kože. Veće uveličanje.

## ZAKLJUČAK

Pri analizi histološkog materijala teško je razgraničiti promene, koje su nastali tokom života, prouzrokovane radom terapeuta, pod jatrogenim dejstvom ili nastali tehničkom obradom tkiva za histološku analizu, od onih koji su nastali kao posledica delovanja faktora koji se ispituju.

Tkiva uzeta za vreme embrionalnog razvoja isključuju navedene greške ad maximum. Istovremeno eksperimenti in vitro su vremenski kraći, ekonomičniji i s obzirom na mogućnost neograničenog broja postavljenih kultura statistička obrada dobijenih rezultata je realnija i sigurnija.

### S a ž e t a k

Autori prikazuju metode ispitivanja kultivisanjem fibroblasta i zubnih začetaka miša u sistemu in vitro.

Rezultati dobijeni kultivisanjem zubnih začetaka miša u raznim fazama embriogeneze pokazuju da ovaj metod ispitivanja (in vitro) pruža izvesne prednosti u odnosu na sistem in vivo.

LEGENDA (u svim slikama): P — pulpa, O — odontoblasti, PD — predentin, D — dentin.

U in vivo sistemu promene nastale tokom života, u toku histološke obrade uzetog materijala, kao i intraoperativno, teško je razlikovati od onih, koje nastaju kao posledica agensa koji se ispituje, što je svedeno na minimum u in vitro sistemu.

Pored ovog, ispitivanja u in vitro sistemu vremenski su kraća i ekonomičnija, mogu obuhvatiti veći broj uzoraka, što je uslov za statističku obradu rezultata.

#### Summary

#### THE METHOD OF CULTIVATION OF TISSUE AND STOMATOLOGICAL INVESTIGATION

The authors report the methods which have been used during the cultivation of fibroblast and tooth embryo in the system in vitro. The results of experiments in the cultivation of the mice tooth embryo, taken intrauterine on the 20—21st day of embryonal development, have indicated that investigation in vitro has some advantages in regard to the system in vivo.

These advantages are as follows:

1. The changes observed during the experiment in vivo either those produced during life time or those created by iatrogenic influence and caused in the technical procedures for histological examination, are reduced to the minimum in the system in vitro.

2. The experiments in the system in vitro are shorter in terms of time and more economical. Therefore, a great number of cultures can be provided and the results of the experiment better presented with statistics.

#### Zusammenfassung

#### METHODEN DER GEWEBSKULTUREN IN DEN STOMATOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Die Autoren beschreiben Untersuchungsmethoden der Gewebe mittels Fibroblasten und Zahnkeimen der Maus in vitro

Resultate die in verschiedenen Phasen der Embryogenese erhalten wurden, beweisen dass die Untersuchungsmethoden in vitro gewisse Vorteile im Vergleich mit Untersuchungen in vivo bieten.

Veränderungen die im Verlaufe des Lebens, im Verlaufe der histologischen Bearbeitung des Materials eintreten, als auch intraoperative Veränderungen, sind nur schwer von jenen welche als Folge des untersuchten Agens stattfinden, zu unterscheiden, was in vitro auf ein Minimum reduziert ist. Untersuchungen in vitro sind zeitlich kürzer und ekonomischer, sie können eine grössere Anzahl von Müstern umfassen, was als Bedingung für die statistische Bearbeitung der Resultate anzusehen ist.

#### LITERATURA

- GERSTNER, R.: Tissue Culture of Pulpal Elements  
O. S., O. M., P. 473—486 sept. 1971
- LÖE, H., KARRING, T., HARA, K.: The Site Of  
Mitotic Activity in rat and Human Oral Epithelium, Scand. J. Dent. Res., 111—119, 1972
- LEIRSKAR, J., HELGELAND, K.: A Methodologie  
Study Of The Effect of Dental Materials On  
Growth And Adhesion Of Animal Cells In  
Vitro, Scand. J. Dent. Res., P. 120—133,  
1972
- HELGELAND, K., LEIRSKAR, J.: A Further Testing  
Of The Effect Of Dental Materials On Growth  
And Adhesion Of Animal Cells In Vitro,  
Scand. J. Dent. Res., P. 206—212, 1972
- SPANGBERG, L., LANGELAND, K.: Biologic Effect  
Of Dental Materials, OS., OM., OP., P. 402—  
—414, 1973
- ČUPRINOVA, I.: Opredelenie citotoksičeskoga dej-  
stvija nekih antiseptičeskikh sredst i plom-  
bivočnoh materijalov v kulture kletok,  
Stomatologija, 3: 20, 1971
- BERLINER, D., ALFREDO, J., GOTTLIEB: Early  
Morfological Changes Produced By Antiinflam-  
matory Steroids on Tissue Culture Fibro-  
blasts, J. Invest. Derm., 44: 48, 1967
- KARADŽOVA, O., KEZELE, D., KUBUROVIĆ, D.,  
SEDLICKI, S.: Rezultati primene kortikoste-  
roida in vivo i in vitro. Prvi Kongres sto-  
matologije i maksilo-facijalne hirurgije, Pa-  
riz, 1973