

<https://doi.org/10.17116/stomat20199803112>

## Выращивание зуба мыши *in situ* методом гомотопической трансплантации эмбрионального зачатка

Г.С. РУНОВА<sup>1</sup>, Л.В. КУЗНЕЦОВА<sup>2</sup>, М.А. МОРОЗОВА<sup>1</sup>, А.Г. АДЖИЕВА<sup>1</sup>, О.В. ЗАЙРАТЬЯНЦ<sup>1</sup>, И.Ю. МАЛЫШЕВ<sup>2</sup>, О.О. ЯНУШЕВИЧ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия; <sup>2</sup>Лаборатория клеточных биотехнологий Научно-исследовательского медико-стоматологического института, ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Тканевая инженерия предлагает восстанавливать утраченный зуб с помощью биологического аналога, выращенного из зачатка зуба. Эти технологии предусматривают длительное культивирование зачатка *in vitro* в биореакторе. Последующие перенос и рост выращенного *in vitro* зуба в челюсти затруднены сложностью интеграции нового зуба с тканью хозяина. Мы предположили, что выращивание зуба с помощью гомотопической трансплантации зачатка *in situ*, т.е. сразу в челюсть, минуя стадию *in vitro*, поможет решить эти проблемы. Цель работы — проверка этой гипотезы. Показана принципиальная возможность переноса зачатка зуба сразу в челюсть, и выращивания *in situ*, исключая этап *in vitro*. Результаты показали хорошую интеграцию выросших зубов с тканями челюсти, без признаков воспаления и появлением в пульпе кровеносных сосудов. Вместе с тем результаты также показали необходимость совершенствования подготовки зачатка зуба к пересадке и хирургическим манипуляциям.

**Ключевые слова:** регенеративная стоматология, эмбриональный зачаток зуба мыши, выращивание зуба, гомотопическая трансплантация, *in situ*.

## Growing of murine tooth *in situ* by homotopic transplantation of embryonic germ

G.S. RUNOVA<sup>1</sup>, L.V. KUZNETSOVA<sup>2</sup>, M.A. MOROZOVA<sup>1</sup>, A.G. ADZHIEVA<sup>1</sup>, O.V. ZAIRAT'YANC<sup>1</sup>, I.YU. MALYSHEV<sup>2</sup>, O.O. YANUSHEVICH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Laboratory of cellular biotechnologies, Scientific Research Institute of Medicine and Dentistry, Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia

Tissue engineering offers to restore the lost tooth using a biological analogue grown from the tooth germ. These technologies provide long-term cultivation of the germ in bioreactor *in vitro*. The subsequent transfer and growth of the *in vitro* grown tooth in the jaw is hampered by difficulty of integration of the new tooth with the host tissue. We suggested that growing tooth by homotopic transplantation *in situ*, that is, immediately in the jaw passing the *in vitro* stage will help to solve these problems. The aim of the work was to test the hypothesis. The principal possibility of transfer of the tooth germ directly into the jaw and cultivation *in situ* eliminating the stage *in vitro* is shown. The results showed a good integration of the grown teeth with the jaw without signs of inflammation and with the appearance of blood vessels in the pulp. At the same time, the results also showed the necessity to improve the preparation of tooth germs for transplantation and surgical procedures.

**Keywords:** regenerative dentistry, mice embryonic tooth germ, tooth growth, homotopic transplantation, *in situ*.

Для корреспонденции: Малышев Игорь Юрьевич — проф., заведующий кафедрой патологической физиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова; тел.: +7(985)177-9070; <https://orcid.org/0000-0002-2381-9612>; e-mail: [iymalyshev1@gmail.com](mailto:iymalyshev1@gmail.com)

В России у людей старше 60 лет, в среднем, удалено по 18 зубов, а у 14% из них полностью отсутствуют зубы. Много молодых людей также по разным причинам не имеют зубов. Утрата зубов происходит в результате заболеваний пародонта, общесоматических заболеваний, плохой гигиены рта, наследственной адентии, спортивных или криминальных травм. Для восстановления механических функций утраченного или разрушенного зуба стоматологи ставят зубные коронки или имплантаты из искусственных материалов. Однако зуб — это орган, он имеет свою нервную, кровеносную и иммунную системы, и в корневой части окружен периодонтальной связкой. У искусственных заменителей нет всех этих структур. Поэтому они не имеют чувствительности, нет ответной реакции на инфекцию, не регенерируют дентин, цемент корня и не амортизируют ме-

ханические нагрузки на челюсть при жевании. Кроме того, искусственные коронки и имплантаты могут провоцировать развитие разных осложнений.

Регенеративная медицина предлагает новые подходы для восстановления зубов, а именно: на место утраченного зуба размещение его биологического аналога, выращенного по законам натурального одонтогенеза или воссозданного с помощью тканевой инженерии [1]. Исследования многих лабораторий мира направлены на то, чтобы вырастить зуб из биоинженерного зачатка, собранного из дентальных эпителиальных и мезенхимальных стволовых клеток [2–4]. Однако при сборке такого зачатка невозможно воспроизвести все сложные эпителиально-мезенхимальные взаимосвязи и особенности естественного зачатка, такие как точное расположение и количественные соотношения разных пулов клеток, степень дифференцировки, состав и архитектура базальной мембраны и экстраклеточ-

ного матрикса, действие механических сил, спектр и динамические концентрации разных факторов роста и т.д. Поэтому зубы, выращенные методами тканевой инженерии, пока можно охарактеризовать лишь как зубоподобные структуры, часто с нарушениями формы и цвета, структуры и минерализации цемента, дентина и эмали.

Кроме того, существующие технологии выращивания зуба из биоинженерного зачатка предусматривают длительное культивирование зачатка *in vitro* под капсулой почки и/или в биореакторе. Последующие трансплантация и рост выращенного *in vitro* зуба в челюсти затруднены сложностью интеграции биоинженерной ткани с тканью хозяина, а также «подключением» к биоинженерному зубу нервной, сосудистой и иммунных систем. Мы предположили, что выращивание зуба из естественного зачатка с помощью гомотопической трансплантации *in situ*, то есть сразу в челюсть, минуя стадию культивирования под капсулой почки или в биореакторе, поможет решить обозначенные выше проблемы.

Цель работы — выращивание зуба *in situ* из его естественного зачатка с сохраненными функциональными связями между эпителием и мезенхимой.

## Материал и методы

Исследования проведены на 8—10-недельных мышасамцах C57BL/6J (филиал «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России) весом 23—28 г. Мыши содержались в виварии в стандартных условиях в индивидуальных клетках.

Для выделения зачатка зуба эмбриона беременных на 14,5-й день мышей декапитировали и делали разрез по брюшной срединной линии ножницами. После этого изолировали матку и помещали ее в охлажденный физиологический раствор (4 °С). Затем выделяли эмбрионы. Эмбриональный зачаток зуба мыши выделяли по методике Tsuji [5]. Зачаток помещали в охлажденный физиологический раствор. Затем выделяли нижнюю челюсть и разрезали пополам (см. рис. 1, а на цв. вклейке). После этого отделяли хрящ Меккеля (хрящ мандибулярной дуги) от нижней челюсти. Зачатки резцов и моляров нижней челюсти очищали от окружающих тканей, оставляя в охлажденном физиологическом растворе (рис. 1, б на цв. вклейке). Морфологическая структура зачатка соответствовала стадии «колпачка» естественного одонтогенеза [6].

Фрагменты челюсти с трансплантированным зачатком оценивали визуально и помещали в 10% нейтральный забуференный формалин. Для гистологического анализа фрагменты челюсти подвергали декальцинации с помощью реагента Биодек R (Италия) и под контролем лупы вырезали участок, содержащий зачаток зуба. Далее, после дополнительного, второго этапа декальцинации, образцы ткани по общепринятой методике заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы толщиной 3—4 мкм, полученные на микротоме Leica (Германия), расправляли на предметных стеклах, депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Для получения гистологического среза имплантированного зачатка зуба и правильной его ориентации материал многократно дорезали методами ступенчатых и серийных срезов, при необходимости меняя положение парафинового блока. Гистологические препараты исследовали и фотографировали на микроскопе Axio Lab.A1 («Carl Zeiss Microscopy», Германия).

## Результаты

Гомотопическую трансплантацию зачатка зуба проводили по специально разработанному для этих целей протоколу. По этому протоколу анестезированную хлоралгидратом (200 мг/кг, в/б) мышь фиксировали за конечности на операционном столике и мордочку обрабатывали спиртом. Верхнюю и нижнюю челюсти фиксировали отдельно. Для лучшего доступа щеку прошивали шовным материалом Prolene 5°0. После создания доступа на правой половине верхней челюсти, отступая на 1 мм от первого моляра вперед, проводили перфорацию небной кортикальной пластинки, без отслаивания слизисто-надкостничного лоскута, твердосплавным бором HM1 204 007 («Meisinger», Германия) (см. рис. 2, а на цв. вклейке). Затем в перфорационное отверстие вводили зачаток зуба (рис. 2, б на цв. вклейке) и после введения рану заклеивали клеем БФ-6.

Через 3 нед мышей декапитировали, и структуры, выросшие из зачатка зуба (рис. 3 на цв. вклейке), выделяли вместе с челюстью. Выделенные структуры оценивали визуально и помещали в 10% нейтральный забуференный формалин для гистологического анализа.

Выросшие структуры из зачатков зубов эмбриона были белыми и твердыми. Гистологическая картина разреза удачно выросшего зуба представлена на рис. 4, а на цв. вклейке. Видны специфические ткани и клетки зуба, с характерным для естественных зубов расположением. Содержимое пульпарной камеры зуба представлено клетками и экстрацеллюлярным матриксом нормально сформированной пульпы с полнокровными сосудами. На границе пульпы и предентины располагаются одонтобласты — высокие призматические клетки. В направлении от одонтобластов к наружной поверхности зуба отчетливо видны слои предентина, дентина и частично — эмали. Дентин прилежит к сформированной периодонтальной связке, а снаружи от некоторых участков эмали сохранены энамелобласты — высокие призматические клетки, ориентированные перпендикулярно поверхности эмали. Обращает на себя внимание четкая симметрия в отложении эмали на поверхности зуба. Хорошо известно, что такое симметричное расположение эмали характерно для моляров грызунов. Таким образом, можно утверждать, что выросший в челюсти зуб не является резцом.

В нашем исследовании было пересажено 8 зачатков. На рис. 4, а представлен наиболее удачно сформировавшийся зуб. Таких зубов было 4. Другие 4 зуба имели признаки аномально сформированных зубов, некоторые с выраженными дистрофическими изменениями, слабой лимфоидной инфильтрацией, отеком пульпы и периодонтальной связки, гибелью одонтобластов и узкими, неоднородной толщины, слоями предентина, дентина и эмали (см. рис. 4, б на цв. вклейке).

## Обсуждение

Во многих лабораториях мира пытаются вырастить мышинные зубы. Понятно, что выращивание зубов лабораторных грызунов не является самоцелью. Главная задача — научиться выращивать зубы человека. Эксперименты на мышах позволили разработать основные принципы и этапы возможной технологии выращивания человеческого зуба. Основные из этих этапов: 1) формирование биоинженерного зачатка зуба из стволовых клеток; 2) *in vitro* культивирование этого зачатка в биореакторе, естествен-

ного происхождения (капсула почки) или искусственно-го изготовления (разные виды технических устройств); 3) трансплантация в челюсть; 4) доразивание до приемлемой интеграции биоинженерного зуба с тканями челюсти и десны мыши.

В этой работе мы впервые показали, что существует принципиальная возможность исключения предварительного этапа *in vitro* культивирования зачатка в биореакторе, и что можно сразу переносить зачаток зуба непосредственно в челюсть, то есть *in situ*. Гистологическое исследование показало хорошую интеграцию выросшего зуба с тканями челюсти и десны, без признаков воспаления и с появлением в пульпе кровеносных сосудов. Тот факт, что наряду с хорошо сформированными зубами (таких зубов было 50%), выросли и плохо сформированные зубы с дистрофическими изменениями их структур, говорит о том, что необходимо дальнейшее усовершенствование подготовки зачатка зуба к пересадке *in situ*, улучшение хирургических манипуляций и возможно более тщательная подготовка ротовой полости.

Для того чтобы появилась возможность начать разработку технологий выращивания человеческих зубов, необходимо ответить на несколько очень сложных вопросов.

1. *Какой биоматериал можно использовать для выращивания зуба человека?* Использование эмбриональных стволовых клеток зачатка зуба позволило вырастить мышинный зуб. Получить аутологичный эмбриональный зачаток зуба для выращивания зуба человека невозможно. Также невозможно использование аллогенных эмбриональных зачатков или стволовых клеток потому, что это ограничено законодательными, религиозными, этическими и моральными причинами, а также риском образования опухоли [7]. Были определенные надежды на использование аутологичных взрослых стволовых и индуцированных плюрипотентных клеток [8, 9]. Однако пока полученные из таких клеток биоинженерные зубы не обладают всей функциональностью естественных зубов.

2. *Как обеспечить интеграцию кровеносной и нервной систем с трансплантированным в челюсть выращенным зубом?* Снабжение питательными веществами и кислородом, а также иннервация необходимы для функционирования и регенерации тканей зуба. Поэтому важно, чтобы новый выращенный и пересаженный зуб стимулировал рост новых

сосудов и нервных окончаний. Вероятно, для этого нужно добавлять соответствующие факторы роста. Технология выращивания зуба *in situ*, аналогичная той, которую мы описали в этой статье, может обеспечить наилучшую интеграцию растущих тканей нового зуба с тканями челюсти и десны хозяина. В наших исследованиях мы действительно видели хорошо сформированные кровеносные сосуды в пульпе выросшего *in situ* зуба.

3. *Как обеспечить разумный, приемлемый для клиники срок выращивания зуба?* В отличие от мышей, у человека для выращивания зуба по законам естественного одонтогенеза потребуется не менее 18—20 мес. Такие сроки не смогут конкурировать с достаточно быстрой установкой искусственных имплантатов. Проблему можно было бы решить, если разработать способ ускоренного роста зубов человека, или, что, вероятно, более осуществимо — разработать технологии биопечати зубов *in situ*.

4. *Как учитывать фактор времени и предупредить возможные осложнения?* Будет ли новый зуб расти в соответствии с ростом окружающих тканей хозяина, и как со временем изменятся свойства пересаженного зуба? Есть данные, что через 20—30 лет пересаженная ткань может инициировать рост опухоли. Как избежать этого риска? Пока мы не можем ответить на эти вопросы.

## Заключение

В следующем десятилетии регенеративная медицина несомненно станет существенным компонентом лечения стоматологических заболеваний! Технологии выращивания зубов могут в значительной степени заменить методы традиционного протезирования. Важно также и то, что технологии выращивания и тканевой инженерии зуба могут помочь развитию технологий регенерации других органов и окажут влияние на всю регенеративную медицину.

**Благодарности:** Обзор написан при поддержке Министерства здравоохранения РФ (Государственное задание Министерства здравоохранения РФ от 2 февраля 2016 г. №056-00139-16, уникальный номер реестровой записи 110 401 000 000 000 000 071 021 02).

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Jamal HA. Tooth organ bioengineering: cell sources and innovative approaches. *Dent J*. 2016;4(18):1-12. <https://doi.org/10.3390/dj4020018>
- Hirayama M, Oshima M, Tsuji T. Development and prospects of organ replacement regenerative therapy. *Cornea*. 2013;32(1):13-21. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3182a18e6c>
- Hashmi B, Zarzar LD, Mammoto T, Mammoto A, Jiang A, Aizenberg J, Ingber DE. Developmentally-inspired shrink-wrap polymers for mechanical induction of tissue differentiation. *Advanced Materials*. 2014;26(20):3253-3257. <https://doi.org/10.1002/adma.201304995>
- Monteiro N, Yelick PC. Advances and perspectives in tooth tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016. <https://doi.org/10.1002/term.2134>
- Tooth regeneration. In: *methods in molecular biology*. Clifton N.J. Vol 1597. 2017;97-116. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6949-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6949-4_8)
- Jussila M, Thesleff I. Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;4(4):a008425. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008425>
- Otsu K, Kumikami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller L, Lesot H, Harada H. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Frontiers in Physiology*. 2014;5:36. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00036>
- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*. 2008;34(2):166-171. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
- Otsu K, Kishigami R, Oikawa-Sasaki A. Differentiation of iPS cells into dental mesenchymal cells. *Stem Cells and Development*. 2012;21(7):1156-1164. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0210>

Поступила 27.02.18

Received 27.02.19



К статье Г.С. Руновой и соавт. «Выращивание зуба мыши *in situ* методом гомотопической трансплантации эмбрионального зачатка»

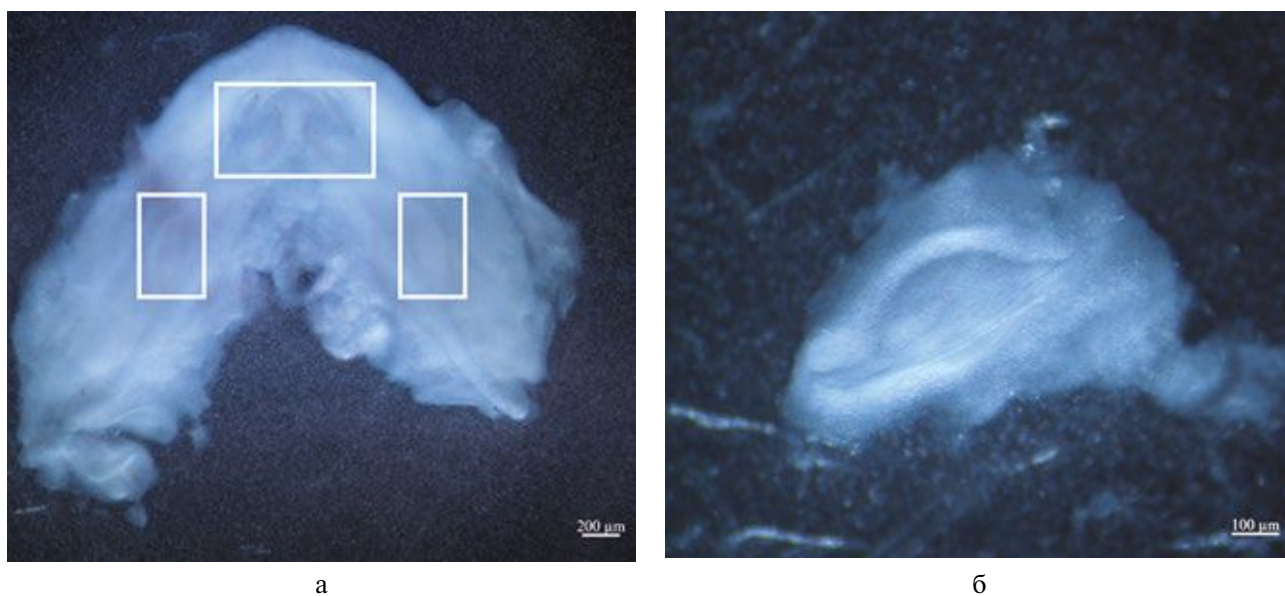


Рис. 1. Выделенная нижняя челюсть эмбриона мыши (а) и выделенный зачаток зуба (б) на 14,5-й день эмбрионального развития.

Рамками выделено расположение зачатков резцов и моляров.

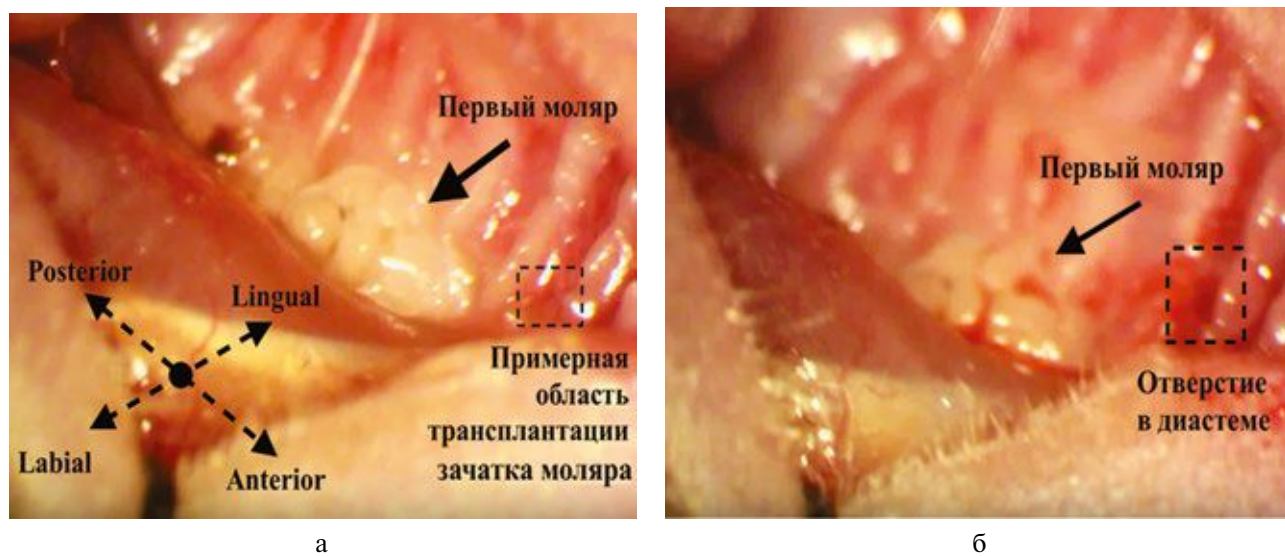
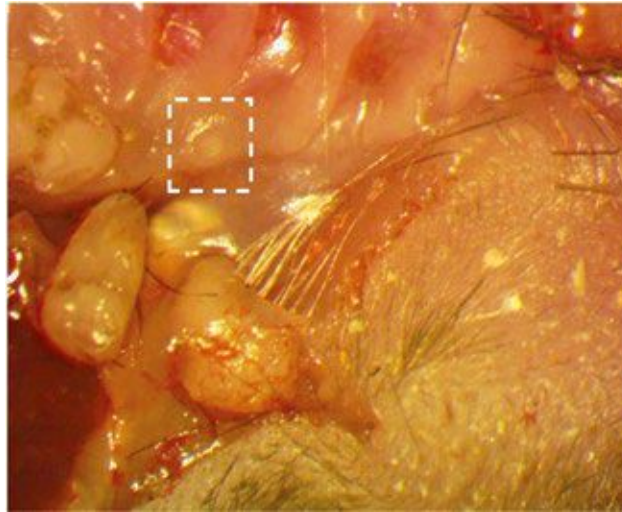
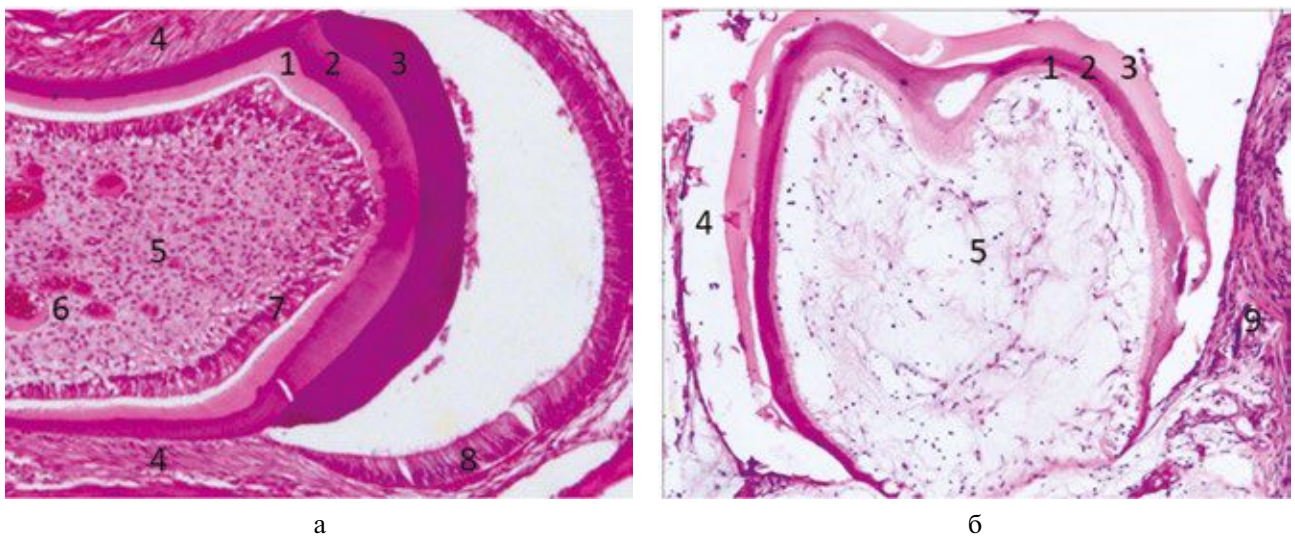


Рис. 2. Операционное поле при трансплантации зачатка моляра мыши в диастему (а) и получившееся перфорационное отверстие в диастеме (б).





**Рис. 3.** Структура, выросшая из трансплантированного в диастему мыши зачатка зуба эмбриона мыши (отмечена прямоугольником).



**Рис. 4.** Репрезентативные примеры гистологической картины правильно сформированного зуба, выросшего в челюсти мыши из зачатка зуба (а) и anomalно сформированного с дистрофическими изменениями и отеком пульпы и периодонтальной связки (б).

а — хорошо сформированный зуб (гистологический срез, параллельный поверхности неба, на уровне подслизистого слоя мягких тканей неба): 1 — предентин, 2 — дентин, 3 — эмаль, 4 — периодонтальная связка, 5 — пульпа с одонтобластами на границе с предентином, 6 — полнокровные сосуды пульпы с перикапиллярным формированием предентина, 7 — одонтобласты, 8 — энамелобласты. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 250; б — плохо сформированный зуб (гистологический срез, перпендикулярный поверхности неба, участок зуба, покрытый эмалью, частично выступал в полость рта): 1 — предентин, 2 — дентин, 3 — эмаль (узкие, неоднородной толщины, слои), 4 — дистрофические изменения и отек периодонтальной связки, 5 — пульпа с выраженными дистрофическими изменениями, слабой диффузной лимфоидной инфильтрацией, отеком и утратой одонтобластов, 9 — окружающие зуб мягкие ткани со слабо выраженной лимфоидной инфильтрацией и дистрофически измененные костные балки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 250.