

<https://doi.org/10.17116/rosstomat20181104150>

Выращивание зуба мыши методом гетеротопической трансплантации эмбрионального зачатка

Л.В. КУЗНЕЦОВА, Г.С. РУНОВА, И.Ю. МАЛЫШЕВ*, О.О. ЯНУШЕВИЧ

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

Потеря зубов приводит к нарушению речи и первичной обработки пищи, ухудшает эстетический вид, здоровье и качество жизни индивида в целом. Для компенсации утраченного зуба используют искусственные имплантаты. Однако эти заменители не воспроизводят всех биологических функций зуба, имеют ограниченный срок эксплуатации и могут провоцировать развитие осложнений. Регенеративная стоматология предлагает новую стратегию для восстановления зубов — использовать выращенные натуральные зубы. Цель работы — выращивание зуба из зачатка. Зачатки зубов извлекали из нижней челюсти эмбриона мышей C57Bl/6J. Гетеротопическую трансплантацию зачатка зуба проводили под почечную капсулу. Через 2 нед из мест трансплантации были выделены сформированные маленькие зубы с хорошо различимыми специфическими зубными клетками, одонтобластами и амелобластами и тканями, пульпой, предентином, дентином и эмалью. Асимметричное отложение эмали выросших зубов позволило идентифицировать их как резцы. В работе показано, что почечное микроокружение взрослой мыши никак не нарушило генетическую программу развития зуба, который в естественных условиях развивается в дентальном микроокружении эмбриона. Этот факт демонстрирует высокую пенетрантность механизмов одонтогенеза.

Ключевые слова: регенеративная стоматология, эмбриональный зачаток зуба мыши, выращивание зуба, ниша стволовых клеток, гетеротопическая трансплантация, пластичность, капсула почки.

Growing of the mouse's tooth by method of heterotopic transplantation of the embryonic germ

L.V. KUZNECOVA, G.S. RUNOVA, I.Yu MALYSHEV, O.O. YANUSHEVICH

Laboratory of cellular biotechnologies, Scientific Research Institute of Medicine and Dentistry, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia; Department of Periodontology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

Tooth loss leads to disruption of speech and primary processing of food, degrades the aesthetic appearance, health and quality of life of the individual generally. Artificial implants usually use to compensate the lost tooth. However, these alternatives do not represent all the biological functions of the tooth, they have a limited lifespan and can provoke complications. Regenerative dentistry offers a new strategy to restore teeth — using of natural grown teeth. The purpose of our work was consisted in growing tooth from tooth germ. Tooth germs were extracted from the lower jaw of the embryo of mice C57Bl/6J. Heterotopic transplantation of the tooth germ was carried out under the renal capsule. There were shaped little teeth with a well-defined specific sets of cells, odontoblasts and ameloblasts and tissues, pulp, predentin, dentin and enamel after 2 weeks of transplantation. Asymmetric deposition of the enamel of received teeth allowed to identify them as cutters. It was shown that the renal microenvironment of the adult mouse did not violate the genetic program of development of the tooth, which develops in the dental microenvironment of the embryo in vivo. This fact demonstrates the high penetrance of the mechanisms of odontogenesis.

Keywords: regenerative dentistry, mice embryonic tooth germ, tooth growth, stem cell niche, heterotopic transplantation, plasticity, renal capsule.

Потеря зубов в результате различных заболеваний, плохой гигиены полости рта или травм приводит к нарушению речи и первичной обработки пищи, ухудшает эстетический вид, здоровье и качество жизни индивида в целом. По данным Второго национального эпидемиологического стоматологического исследования, в России у людей старше 65 лет в среднем удалено по 18 зубов, а 14% людей являются пол-

ностью беззубыми. Среди молодых людей до 30 лет также есть много тех, кто по разным причинам уже не имеет зубов. Для компенсации утраченного зуба используют искусственные коронки или имплантаты. Однако они не имеют иммунных клеток, нервных окончаний и кровеносных сосудов, цемента и периодонтальных связок и поэтому не реагируют на инфекцию, не имеют чувствительности, не регенерируют

дентин и не имеют амортизирующей подложки, как натуральные зубы. Искусственные заменители зубов имеют ограниченный срок эксплуатации и могут провоцировать развитие различных осложнений.

Новую стратегию восстановления утраченных зубов предлагает регенеративная стоматология, а именно размещать на место утраченного зуба натуральный зуб, выращенный по законам естественного одонтогенеза или созданный с помощью методов тканевой инженерии [1]. Современные исследования направлены главным образом на выращивание зуба из биоинженерного зачатка, собранного из дентальных эпителиальных и мезенхимальных клеток [2–4]. Однако при сборке биоинженерного зачатка невозможно воспроизвести сложные эпителиально-мезенхимальные взаимосвязи и все особенности натурального зачатка (тем более, что многие из них до сих пор не изучены и не известны), такие как точная компартиментализация клеток, количественные соотношения разных пулов клеток и степень их дифференцированности, состав и расположение базальной мембраны, состав и архитектура экстраклеточного матрикса и т.д. Поэтому выращенные биоинженерные зубы можно было охарактеризовать лишь как зубоподобные образования с нарушениями минерализации, формы, цвета и структуры дентина и эмали.

Цель настоящей работы — выращивание зуба из натурального зачатка с ненарушенными структурой и эпителиально-мезенхимальными функциональными связями.

Материал и методы

Исследования выполнены на мышах C57Bl/6J (Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) весом 25–30 г ($n=7$). Во время экспериментов мышья содержались в индивидуальных клетках в виварии в стандартных условиях.

Выделение эмбрионального зачатка зуба мыши проводили по методике Tsuji [5]. Эмбрионы извлекали на эмбриональный день (ЭД) 14.5 сразу после декапитации мыши и помещали в охлажденный (4 °С) физиологический раствор. Нижнюю челюсть изолировали и разрезали пополам (рис. 1). Затем отделяли хрящ мандибулярной дуги эмбриона (хрящ Меккеля) от тканей нижней челюсти. Оставшаяся часть нижней челюсти содержала зачатки резца и моляра. Зачатки очищали от окружающих тканей и помещали в охлажденный (4 °С) физиологический раствор (см. рис. 1). Кроме того, изолировали небольшой кусочек эмбриональной челюсти, не содержащий зачатка зуба. Этот кусочек ткани использовали в качестве отрицательного контроля.

Гетеротопическую трансплантацию зачатка зуба и кусочка эмбриональной челюсти проводили под почечную капсулу. Для этого анестезированную хлоралгидратом (200 мг/кг, в/б) мышью фиксировали за ко-

нечности на операционном столике. Затем делали разрез кожи длиной около 2 см и при помощи пинцета отделяли кожу от мышечного слоя, разрезали мышечный слой и доставали почку. После этого скальпелем делали надрез почечной капсулы длиной 2–3 мм, при помощи пинцета отделяли небольшой участок капсулы от паренхимы почки и помещали заранее подготовленный зачаток зуба или кусочек эмбриональной челюсти в пространство между капсулой и паренхимой почки. Затем аккуратно возвращали почку в брюшную полость и зашивали разрез послойно.

Через 2 нед животных умерщвляли методом декапитации, структуры, выросшие из зачатка зуба и кусочка эмбриональной челюсти, выделяли, оценивали визуально и помещали в забуференный 10% формалин для последующего гистологического исследования (рис. 2).

Результаты

На рис. 1 представлены выделенная нижняя челюсть эмбриона мыши (а) и зачаток зуба (б) под микроскопом на ЭД 14.5. Морфологическая структура зачатка соответствовала стадии «колпачка» естественного одонтогенеза [6].

Через 2 нед после гетеротопической трансплантации эмбрионального зачатка зуба под почечную капсулу из мест трансплантации были выделены сформированные маленькие зубы (рис. 2).

Гистологическая картина поперечного разреза выращенного зуба представлена на рис. 3, а. Хорошо видны все специфические ткани и клетки зуба с расположением и последовательностью, характерными для натуральных зубов. Внутреннее содержимое зуба представлено клетками пульпы, на наружной поверхности которой располагаются удлиненной формы высокие призматические клетки — одонтобласты. Дальше в направлении от одонтобластов к поверхности зуба видны преддентин и сформированный дентин. За слоем дентина следует слой эмали, покрытый амелобластами — высокими призматическими клетками, ориентированными перпендикулярно поверхности эмали.

Обращает на себя внимание четкая асимметрия в отложении эмали по окружности зуба: с одной стороны зуба эмаль формирует толстый слой (см. рис. 3, а), а с противоположной — эмаль практически отсутствует. Хорошо известно, что такое асимметричное расположение эмали характерно для резцов грызунов. Эта особенность необходима для формирования режущего края резца. Таким образом, можно утверждать, что выросший под капсулой почки зуб представляет собой резец.

Через 2 нед после гетеротопической трансплантации эмбрионального кусочка челюсти из мест трансплантации были также выделены хряще/костноподобные структуры. Они были значительно менее тверды-

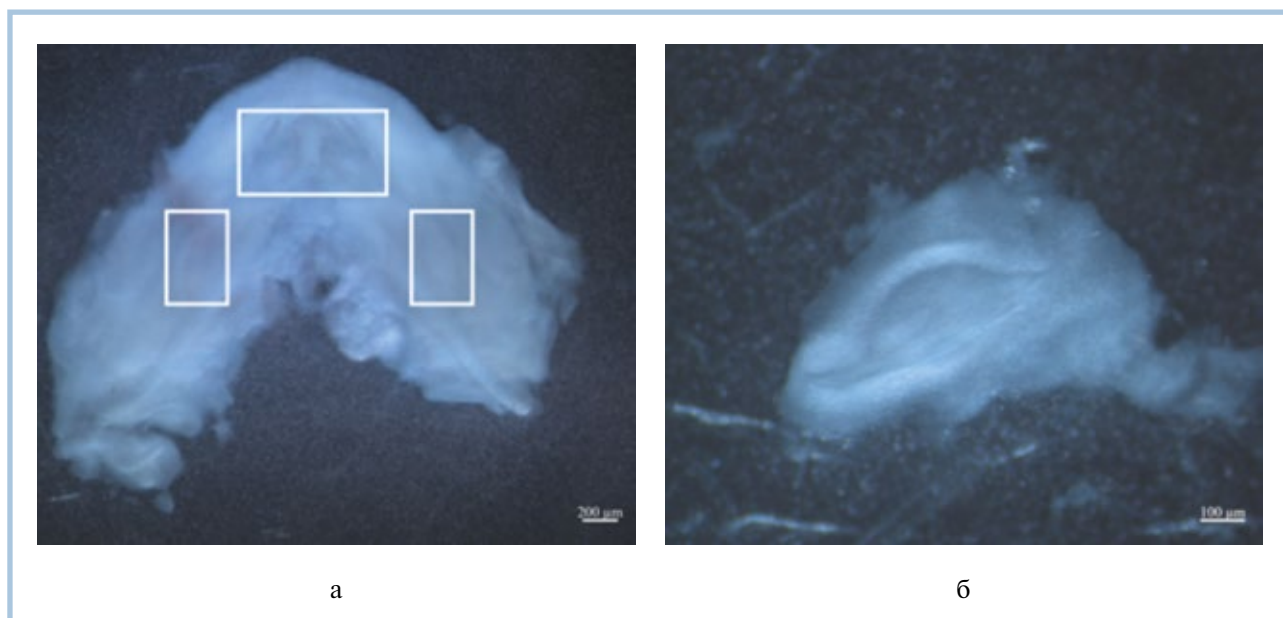


Рис. 1. Нижняя челюсть (а) и зачаток зуба (б) на ЭД 14.5. Рамками выделены районы расположения зачатков резцов и моляров.



Рис. 2. Пробирка со структурами, выделенными через 2 нед после трансплантации зачатков зубов под капсулу почки.

ми, чем выращенные зубы. Гистологическая картина этих выращенных образований представлена на **рис. 3, б**. На гистологическом препарате видна мезенхима с формирующимися костными трабекулами с остеобластами и хрящевой тканью. На этом препарате не обнаружили ни один из специфических видов зубных клеток или ткани. Наиболее вероятно, что эта гистологическая структура представляет собой растущую после гетеротопической трансплантации альвеолярную кость.

Обсуждение

К настоящему времени накопилось большое количество данных о том, что стволовые клетки после гетеротопической трансплантации под действием

другого микроокружения могут менять свой фенотип. Так, G. Ferrari и соавт. показали, что костный мозг взрослой мыши содержит стволовые клетки, которые в специфическом микроокружении могут приобретать фенотип мышечных клеток [7]. Было также показано, что стволовые клетки, которые могут дифференцироваться в нейроны, под действием микроокружения молочных желез утрачивают нейрональную идентичность [8]. Наконец, Y. Barrandon и соавт. [9] продемонстрировали, что эпителиальные клетки взрослого и эмбрионального тимуса мыши после гетеротопической трансплантации в кожу приобретают фенотип мультипотентных стволовых клеток луковицы волоса, а при обратной трансплантации в тимус восстанавливают свой фенотип. Способность клеток менять свой фенотип под действием микроокружения была определена как пластичность [10].

Сигналы, генерируемые в микроокружении взаимодействием клеток между собой и с экстраклеточным матриксом, действием растворимых молекул, физическими и химическими факторами, определяют судьбу стволовой клетки — останется ли она в состоянии покоя, начнет делиться симметрично или асимметрично, продуцируя одну стволовую клетку, а другую дифференцированную. Изучение механизмов действия этих сигналов привело к рождению концепции ниши стволовых клеток [11]. Под нишей стволовых клеток понимают микросреду, в которой находятся эти клетки и из которой они получают сигналы, определяющие их фенотип [12].

В нашей работе продемонстрирован интересный факт, что, несмотря на серьезное изменение микроокружения зачатка зуба под капсулой почки, из стволовых клеток зачатка зуба все же вырос зуб. Почечное микроокружение взрослой мыши никак не наруши-

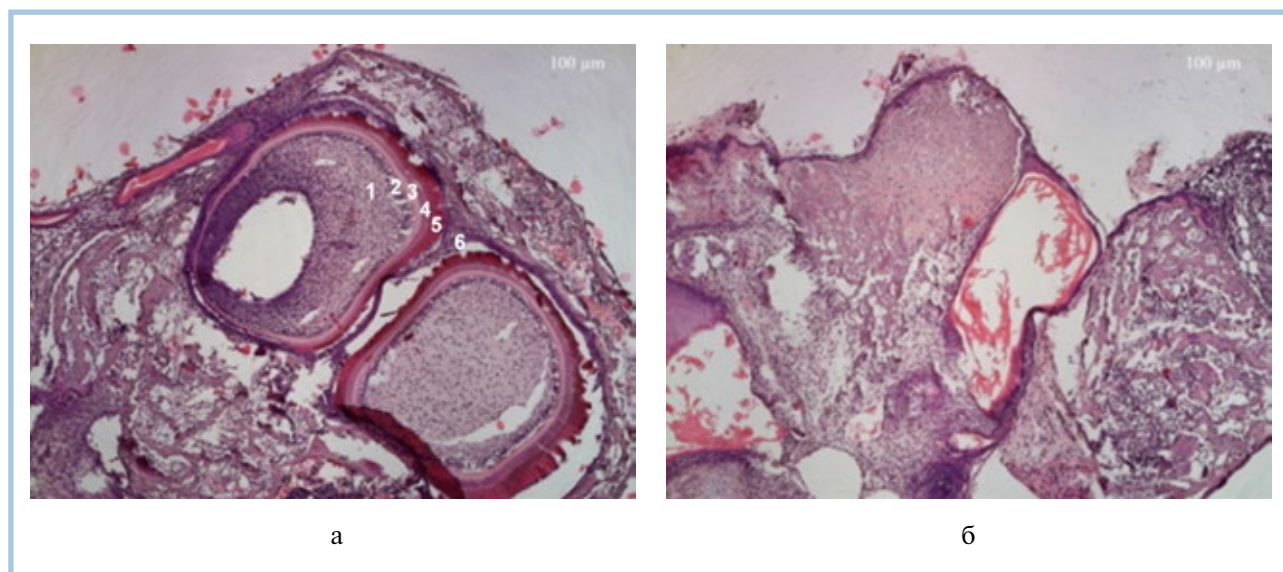


Рис. 3. Гематоксилин-эозинное окрашивание структур, выделенных через 2 нед после гетеротопической трансплантации зачатка зуба (а) и кусочка челюсти эмбриона мыши (б) под капсулу почки.

1 — пульпа; 2 — одонтобласты; 3 — предентин; 4 — дентин; 5 — эмаль; 6 — амелобласты.

ло генетическую программу одонтогенеза, которая в естественных условиях развивается в дентальном микроокружении эмбриона. Этот факт демонстрирует высокую пенетрантность механизмов одонтогенеза. Работа А. Lechgue и соавт. [13] позволит сделать такой же вывод. Эти исследователи показали, что клетки эмбриональных зачатков моляров мыши через 2 нед после трансплантации под кожу, так же как и в наших экспериментах после трансплантации под капсулу почки, сформировали зуб. Это, казалось бы, противоречит понятию пластичности и концепции ниши стволовых клеток. Почему стволовые клетки эмбрионального зачатка зуба, несмотря на пересадку в другое микроокружение, под капсулу почки или кожу, все равно дифференцируются в одонтогенном направлении и продуцируют зуб?

Устранить противоречие и «примерить» наши данные и данные А. Lechgue и соавт. [13] с представлениями о пластичности стволовых клеток и концепцией ниши стволовых клеток можно, если допустить, что при переносе зачатка зуба в другое, «не одонтогенное» микроокружение вместе со стволовыми клетками зачатка переносится и их «одонтогенная» ниша, сформированная матриксом зачатка зуба. Тогда становится понятным, почему, несмотря на смену тканевого окружения с ротового на почечное или подкожное, все равно из дентальных стволовых клеток зачатка формируется зуб. В этом случае ткань-реципиент (почка или кожа) выполняет важные, но не специфические для дифференцировки стволовых клеток функции, а именно поддержание нормальной температуры и — благодаря кровотоку — снабжение зачатка кислородом и питательными веществами.

Во всем мире выращивание зуба мыши не является самоцелью. Главная цель — научиться выращивать человеческие зубы. Для этого необходимо ответить на несколько очень сложных вопросов:

1. *Какой исходный биоматериал выбрать для выращивания зуба человека?* В эксперименте на мышцах использование эмбриональных клеток зачатка зуба позволяет вырастить зуб. Однако для выращивания человеческого зуба невозможно получить аутологичный эмбриональный зачаток зуба, а использование аллогенных эмбриональных зачатков или стволовых клеток ограничено законодательными, этическими, религиозными и моральными причинами, а также риском образования опухоли [14]. Поэтому исследователи попробовали использовать аутологичные взрослые и индуцированные плюрипотентные клетки для создания биоинженерных зубов [15, 16]. Однако пока полученные биоинженерные зубы не воспроизводят всю совокупность свойств натурального зуба.

2. *Как обеспечить кровоснабжение и иннервацию пересаженного в челюсть выращенного зуба?* Снабжение кровью и иннервация необходимы для функционирования зуба. Поэтому важно, чтобы новый зуб стимулировал ревазуляризацию и реиннервацию. Вероятно, эту проблему можно решить добавлением факторов роста сосудов и нервов.

3. *Как обеспечить приемлемый срок выращивания зуба?* Если воспроизводить естественный одонтогенез, выращивание зуба человека потребует нескольких лет. Такие зубы не смогут конкурировать с искусственными имплантатами. Проблему можно было бы решить, если разработать способ ускоренного роста зубов человека.

4. Как при пересадке выращенного зуба учитывать фактор времени? Будет ли новый зуб расти в соответствии с ростом окружающих тканей, и как со временем изменятся свойства пересаженного зуба? Есть данные, что через 20–30 лет пересаженная ткань может инициировать рост опухоли.

Заключение

Не вызывает сомнения, что в следующем десятилетии регенеративная стоматология станет неотъемлемым компонентом лечения многих заболеваний зубов. Есть основания полагать, что технологии выращивания зубов в значительной степени заменят су-

ществующие методы протезирования зубов. Важно и то, что разработанные технологии выращивания зуба могут помочь развитию технологий регенерации других органов и окажут влияние на всю регенеративную медицину.

Благодарности. Авторы благодарны М.А. Морозовой за техническую помощь в оформлении статьи. 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.). 2017;1597:97-116. 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>
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science.* 1998;279(5356):1528-1530. <https://doi.org/10.1126/science.279.5356.1528>
- Booth BW, Mack DL, Androutsellis-Theotokis A, McKay RDG, Boulanger CA, Smith GH. The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(39):14891-14896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803214105>
- Bonfanti P, Claudinet S, Amici AW, Farley A, Blackburn CC, Barrandon Y. Microenvironmental reprogramming of thymic epithelial cells to skin multipotent stem cells. *Nature.* 2010;466(7309):978-982. <https://doi.org/10.1038/nature09269>
- Bonfanti P, Barrandon Y, Cossu G. «Hearts and bones»: The ups and downs of «plasticity» in stem cell biology. *EMBO Mol Med.* 2012;4(5):353-361.
- Redondo PA, Pavlou M, Loizidou M, Cheema U. Elements of the niche for adult stem cell expansion. *J Tissue Eng.* 2017;8:1-18. <https://doi.org/10.1177/2041731417725464>
- Redondo PA, Pavlou M, Loizidou M, Cheema U. Elements of the niche for adult stem cell expansion. *J Tissue Eng.* 2017;8:1-18. <https://doi.org/10.1177/2041731417725464>
- Lechguer AN, Couble ML, Labert N, et al. Cell Differentiation and Matrix Organization in Engineered Teeth. *J Dent Res.* 2011;90(5):583-589. <https://doi.org/10.1177/0022034510391796>
- Otsu K, Mika KS, Naoki F, Kazuko K, Laetitia K, Hervé, Hidemitsu 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>