

УДК 612.311.1

## ИМИТАЦИЯ ЕСТЕСТВЕННОГО ЭНАМЕЛОГЕНЕЗА В БИОИНЖЕНЕРИИ ЭМАЛИ

Меликадзе Н. Г.<sup>1</sup>, Василенко С. А.<sup>1</sup>

Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» КФУ им. В. И. Вернадского, Симферополь, email: nikmelik@yandex.ru

### **Аннотация.**

Эмаль – высокоорганизованная бесклеточная ткань, которая продуцируется энамелобластами (Eb) до прорезывания зуба. Энамелогенез состоит из 2-х основных этапов: секреции и созревания, для которых характерны свои особенности морфологии и функционирования Eb. После прорезывания Eb подвергаются апоптозу, эмаль становится бесклеточной и теряет способность к регенерации. В течение последних десятилетий разработаны инновационные методы клеточной инженерии, основанные на воспроизведении биологии энамелогенеза в лабораторных условиях. Прогресс в биоинженерии эмали связан с поиском источников клеток-предшественников Eb, идентификацией сигнальных молекул, инициирующих их дифференцировку, разработкой соответствующих скаффолдов и оптимальных условий культивирования клеток. Известно, что неэнамелобластные компоненты эмалевого органа: клетки промежуточного слоя, звездчатого ретикулюма, наружного эпителия, Гертвиговского эпителиального корневого влагалища, помимо обеспечения формы зуба, транспорта минералов и безопасного прорезывания, являются резервуаром стволовых клеток, способных дифференцироваться в Eb. Однако значительная степень их дедифференцировки препятствует секреции амелогенина и других белков эмали. Исследуются альтернативные источники стволовых клеток: эпителиальные островки Малассе, эпителиальные клетки десен, индуцированные стволовые плюрипотентные клетки, стволовые клетки кератиноцитов человека. Получение биоинженерных имплантов с эмалеподобной тканью является уникальной задачей регенеративной стоматологии.

Ключевые слова: Энамелобласты, энамелогенез, клеточная инженерия эмали, стволовые клетки.

## IMITATION OF NATURAL ENAMELOGENESIS IN ENAMEL BIOENGINEERING

Melikadze N. G.<sup>1</sup>, Vasilenko S. A.<sup>1</sup>

Institute "S. I. Georgievsky Medical Academy" of V. I. Vernadsky KFU, Simferopol, email: nikmelik@yandex.ru

### **Abstract.**

Enamel is a highly organized cell-free tissue that is produced by ameloblasts (Eb) before the tooth eruption. Enamelogenesis consists of 2 main stages: secretion and maturation, which are characterized by their own features of the morphology and functioning of Eb. After eruption, Eb is subjected to apoptosis, the enamel becomes cell-free and loses its ability to regenerate. Over the past decades, innovative methods of cell engineering have been developed based on the reproduction of the biology of enamelogenesis in laboratory conditions. Progress in enamel bioengineering is associated with the search for sources of Eb progenitor cells, the identification of signaling molecules that initiate their differentiation, the development of appropriate scaffolds and optimal conditions for cell culture. It is known that the non-ameloblastic components of the enamel organ: the cells of the intermediate layer, the stellate reticulum, the external epithelium, the Gertwig epithelial root sheath, in addition to providing transport of minerals, the shape of the tooth and safe eruption, are a reservoir of stem cells capable of differentiating into Eb. However, a significant degree of their dedifferentiation prevents the secretion of amelogenin and other enamel proteins. Alternative sources of stem cells are investigated: Malasse epithelial islets, gingival epithelial cells, induced pluripotent stem cells, human keratinocyte stem cells. Obtaining bioengineered implants with enamel-like tissue is a unique task of regenerative dentistry.

Key words: Enameloblasts, enamelogenesis, enamel cell engineering, stem cells.

**Введение.** Эмаль зуба представляет собой уникальную высокоминерализованную ткань, состоящую из длинных параллельных кристаллов апатита, образующих эмалевые призмы. Энамелогенез осуществляется до прорезывания зуба, после чего способность образовывать новую эмаль теряется навсегда. Отсутствие естественных средств для регенерации эмали привело к тому, что на протяжении многих лет методы реставрационной

стоматологии заключались в создании синтетических заменителей эмали (амальгамы, золота, фарфора, фотополимерных материалов). Однако в течение последних десятилетий разработаны инновационные методы культивирования клеток, имитирующие биологические аспекты энамелогенеза. Предложено несколько путей тканевой инженерии эмали: синтез эмали с использованием физико-химических средств, рост кристаллов эмали под действием белковой матрицы, реминерализация поверхности эмали, клеточная инженерия эмали и, наконец, биологическая регенерация эмали, основанная на индукции de novo морфогенеза зубов[1].

**Цель исследования:** изучить литературные данные о возможностях биоинженерии эмали.

**Материал и методы исследования:** контент-анализ литературных источников.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Как известно, в начале своего развития одонтогенный эпителий образует эмалевый орган (ЭО), который затем формирует коронку зуба и шеечную петлю [2]. Коронковая часть ЭО дифференцируется в четырехслойную «шапочку», внутренний слой которой расположен на границе с дентинобластами и представлен преэнамелобластами. Клетки шеечной петли образуют мощную клеточную оболочку, которая определяет форму корня зуба. Секреция дентина является пусковым моментом для дифференцировки преэнамелобластов в секреторные Eb, которые образуют белковый матрикс эмали и осуществляют его последующую минерализацию [3]. Одновременно происходит изменение полярности клеток, в результате базальный и апикальный полюсы меняются своими местами. Комплекс Гольджи и центриоли смещаются к полюсу, обращенному к дентинобластам, ставшему теперь апикальным, а митохондрии и ядро локализуются в базальной части клетки, обращенной к промежуточному слою. Секреторный Eb – это высокая призматическая клетка (высота – 70–90 мкм, диаметр – 5мкм) с развитым комплексом Гольджи и гранулярной ЭПС, цистерны которой ориентированы вдоль оси клетки. В апикальной части образуется отросток Томса треугольной формы, предназначенный для экзоцитоза секреторных пузырьков.

Образование эмали включает в себя 2 основные стадии: секреторную и созревания. Исходный матрикс эмали состоит из 60–70% воды, 20–30% белков и 15–20% минеральных ионов. Такая эмаль представляет собой гелеобразную ткань, не способную выполнять свои функции. Белковая матрица эмали представлена 3 основными белками: энамелином, амелогенином и амелобластином, среди которых амелогенин составляет более 90% от общего объема. Другие белки включают протеазы: матриксная металлопротеиназа 20 (MMP20) и калликреин 4 (KLK4), которые облегчают посттрансляционный процессинг белков матрикса эмали, способствуют зарождению кристаллов гидроксиапатита, их росту

вдоль оси Eb и контролируют расстояние между кристаллами. Недавно этот список был дополнен амелотином и одонтогенным белком. В стадии созревания Eb укорачиваются (становятся 40 мкм в высоту), теряют отросток Томса, органеллы, участвующие в процессах секреции, подвергаются аутофагии. При этом 25% Eb погибают путем апоптоза и фагоцитируются. Функция Eb в стадии созревания – транспорт ионов, обеспечение кислотно-щелочного баланса, абсорбция органических веществ и воды. Завершение процесса минерализации приводит к тому, что в зрелой эмали содержится 1% органических веществ, а оставшиеся 99% объема занимает неорганический материал, в основном апатиты [1]. На стадии созревания обнаруживаются Eb 2-х типов. У Eb 1-го типа на апикальной поверхности образуется исчерченный край (RA). Установлено, что эти клетки участвуют преимущественно в активном транспорте неорганических ионов, которые переносятся через их цитоплазму и выделяются на апикальной поверхности. Они обладают высокой концентрацией Ca-связывающих белков. У Eb 2-го типа, на апикальной поверхности образуется гладкий край (SA). Эти клетки осуществляют резорбцию органических веществ и воды из первичной эмали. После завершения созревания эмали Eb вместе с клетками промежуточного слоя и звездчатым ретикулюмом образуют редуцированный зубной эпителий (вторичную кутикулу эмали), т.о. зрелая эмаль становится бесклеточной [3, 4].

Классические подходы тканевой инженерии эмали основываются на копировании биологии энамелогенеза в лабораторных условиях и включают в себя взаимодействие тканеспецифических стволовых клеток (SC), соответствующих скаффолдов и сигнальных молекул, инициирующих дифференцировку клеток и образование ткани *de novo*. Поскольку Eb, синтезирующие эмаль, утрачиваются после прорезывания, проводится активный поиск альтернативных источников для регенерации. В настоящее время тщательному изучению подвергаются неэнамеобластные компоненты ЭО, которые традиционно рассматривались как вспомогательные клетки, обеспечивающие форму зуба, транспортировку минералов для секреции эмали и безопасное прорезывание. В серии исследований по маркировке клеток и отслеживанию путей их дифференцировки выявлено, что маркер стволовости эпителиальных клеток P63 определяется в клетках промежуточного слоя, звездчатом ретикулюме, базальных клетках орального эпителия. Клетки промежуточного слоя богаты щелочной фосфатазой и неорганическими фосфатами и связаны с Eb многочисленными десмосомами и нексусами, что объясняет их функцию как транспорт фосфатов и стабилизация ЭО. Однако щелочная фосфатаза является также маркером SC. Предполагается, что P63 поддерживает стволовость эпителия посредством передачи сигналов Sonic Hedgehog (SHH), WNT и Notch. Кроме того, отмечено перемещение клеток внутри ЭО от звездчатого ретикулюма к промежуточному слою и затем слою Eb, что позволяет рассматривать их как резервуар SC. На стадии прорезывания

пролиферирующие клетки выявлены также в апикальном сосочке и в области бифуркации корней. После прорезывания зуба Р63 обнаружен в клетках Гертвиговского эпителиального корневого влагалища (HERS), которое является продолжением наружного эпителия ЭО. В свою очередь, наружный эпителий, являясь источником постоянного замещения зубов у рептилий, рассматривается в качестве морфогенетической эпителиальной ткани с наивысшим регенераторным потенциалом [2].

Известно, что клетки первичного ЭО, выращенные на слоях питательных клеток, экспрессируют амелогенин, амелобластин, MMP 20, KLK4 и другие белки, связанные с эмалью [1]. Создано несколько клеточных линий, происходящих из ЭО. Среди них клетки-предшественники Eb мыши (ALC-ameloblast lineage cell line), которые были выращены на коллагене I типа и требуют добавления в среду эпителиального фактора роста (EGF). Отмечена способность клеток этого вида экспрессировать амелогенин и туфтелин (кислый белок эмали, обеспечивающий ее минерализацию), что говорит об их сходстве с Eb. Клеточная линия НАТ-7 была получена из апикального конца резцов 6-дневных крыс и культивирована на коллагеновой губке в присутствии клеток-предшественников цементобластов (для создания эпителиально-мезенхимальной индукции). Клетки НАТ-7 экспрессировали повышенный уровень амеогенина и амелобластина. Третья линия LS8 является самой старой, она была создана более 30 лет назад для изучения процессов развития эмали. Клетки этой линии также экспрессируют высокие уровни амелогенина, амелобластина, энамелина, MMP 20 [1, 5]. Однако ни одна из этих линий не образует эмалеподобные структуры, поскольку иммортализация связана со значительной степенью дедифференцировки клеток, препятствуя Э-б поддерживать уровень зрелости, необходимый для секреции амелогенинов и других белков эмали. В результате были исследованы другие источники SC Eb, включая клетки эпителиальных островков Малассе (ERM), эпителиальные клетки десен, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) и SC кератиноцитов человека (hKSC) [6]. Доказано, что первично культивируемые клетки HERS и ERM обладают примитивной популяцией SC. Так, клетки ERM способны к дифференцировке в костные, жировые и хрящевые клетки *in vitro*, они образуют кости, цементоподобные структуры и Шарпеевские волокна. При этом ERM, выращенные *ex vivo*, экспрессируют как маркеры мезенхимальных СК (CD 44, CD29, 90в), так и маркеры эпителиальных предшественников (цитокератин-8, E-кадгерин, белок эпителиальной мембраны -1). Линия ERM была успешно получена из пародонта человека, зубов мудрости и здоровых премоляров. При совместном культивировании клеток ERM с клетками пульпы они дифференцируются в эмалеподобные клетки и проявляют минерализационную активность [7]. Для биоинженерии зачатка зуба из неэмбриональных источников предложено использовать эпителиальные клетки десен человека. После

ферментативного расщепления и культивирования их ассоциировали с мезенхимой эмбриональных зубов мышей, после чего трансплантировали в почечные капсулы взрослых мышей. Через 6 недель из зубных зачатков сформировались зубоподобные структуры. При этом в коронковой части наблюдалась минерализация более высокой плотности, что соответствовало эмали. В то же время минерализация более низкой плотности, соответствующая дентину, занимала как коронковую часть, так и область корня и формировала камеру пульпы. При гистологическом исследовании в области эмали обнаружены эпителиальные клетки кубической формы, напоминающие Eb стадии созревания, а в области цемента обнаружены ERM [8]. Изучается возможность использования в биоинженерии iPSC, поскольку они обладают неограниченными способностями к экспансии и могут обеспечить необходимое для регенерации количество SC. В эксперименте показано, что совместное культивирование iPSC мыши с эпителиальными клетками привело к образованию клеток с эпителиально-подобной морфологией, которые экспрессировали маркеры эпителиальных клеток, p63 и цитокератин-14, а также маркеры Eb (амелобластин и эмелин). Эпителиальные пласты, полученные из iPSC человека, способны дифференцироваться в структуры зубов при совместном культивировании с мезенхимой зубов мышей. Их имплантация приводит к образованию зубоподобных структур, содержащих пульпу, дентин и эмалевое пространство. Анализ химического состава и физических свойств образовавшихся зубных структур показал, что они похожи на постоянные человеческие зубы. Оценка экспрессии специфических антигенов человека показала, что только эпителиальные компоненты зуба возникли из имплантированных дифференцированных iPSC, тогда как пульпа зуба и окружающие костеподобные структуры произошли от мезенхимальных клеток зубов мышей, а не от iPSC. Эти результаты показывают, что эпителиальные клетки дают начало эмаль-образующим Eb, в то время как мезенхимальные SC образуют дентинобласты и пульпу зуба [9].

Аналогичным образом на трехмерном каркасе из агарозы культивировали SC кератиноцитов человека в сочетании с зубной мезенхимой эмбриона мыши, SHH и фактором роста фибробластов-8 (FGF-8). Трансплантированные в почечные капсулы мышей, они оказались способны к Eb дифференцировке и образованию эмали [10]. Высказывается предположение, что в эпителиально-мезенхимальных взаимодействиях помимо SHH и FGF-8 участвуют другие сигнальные молекулы, включая wntless (Wnt), костный морфогенетический белок (BMP), трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). BMP и FGF в нише эпителиальных SC в резцах мышей регулируют отложение эмали. Мезенхимальные сигналы, участвующие в индукции Eb, включают TGF- $\beta$ 1, BMP-4 и BMP-2, при этом передача сигналов BMP является решающей для дифференцировки Eb и образования эмали. Передача

сигналов SHN сохраняет нишу SC, присутствующую в клетках шеечной петли моляров. Кроме того, SHN в клетках промежуточного слоя ЭО поддерживает дифференцировку и созревание Eb. Eb также экспрессируют факторы транскрипции, такие как Msx2 и Sp6, которые играют важную роль в энамелогенезе. Использование этих молекул может помочь генерировать предшественники Eb, инициировать их дифференцировку и синтез эмали [6].

**Заключение.** Прогресс биоинженерии эмали ограничен из-за высокого уровня специализации и чрезвычайно сложного эпителиально- мезенхимального взаимодействия клеток, участвующих в энамелогенезе. Для воспроизведения процессов развития эмали используются различные типы эпителиальных предшественников, идентифицируются сложные сигнальные каскады, регулирующие клеточную дифференцировку, разрабатываются соответствующие скаффолды и оптимальные условия культивирования клеток. Получение биоинженерных имплантов с эмалеподобной тканью в области коронки является уникальной задачей регенеративной стоматологии.

#### **Список литературы.**

1. Pandya Mirali, Diekwisch Thomas G. H. Enamel biomimetics — fiction or future of dentistry // International Journal of Oral Science. 2019. Volume 11. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nature.com/articles/s41368-018-0038-6> (дата обращения 10.07.2021).
2. Liu Hui , Yan Xiulin, Pandya Mirali, Luan Xianghong, Diekwisch Thomas G.H. Daughters of the Enamel Organ: Development, Fate, and Function of the Stratum Intermedium, Stellate Reticulum, and Outer Enamel Epithelium. Stem Cells Dev. 2016. vol. 25. no. 20. P. 1580 – 1590. doi: 10.1089/scd.2016.0267.
3. Lacruz Rodrigo S., Habelitz Stefan, Wright J. Timothy, Paine Michael L. Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease. Physiological Reviews. Vol. 97, no. 3. [Электронный ресурс]. URL: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00030.2016> (дата обращения 10.07.2021).
4. Быков В. Л. Гистология и эмбриональное развитие органов полости рта человека. ГЭОТАР-Медиа, 2014.624 с.
5. Juni Sarkar, Emil J. Simanian, Sarah Y. Tuggy, John D. Bartlett, Malcolm L. Snead, Toshihiro Sugiyama, Michael L. Paine. Comparison of two mouse ameloblast-like cell lines for enamel-specific gene expression. Front Physiol. 2014. no. 5. P. 277. doi: 10.3389/fphys.2014.00277.
6. Geraldine M. Ahmed, Eman A. Abouauf, Nermeen AbuBakr, Christof E. Dörfer and Karim Fawzy El-Sayed Tissue Engineering Approaches for Enamel, Dentin, and Pulp Regeneration: An Update // Stem Cells International. 2020. volume 2020. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2020/5734539/> (дата обращения 10.07.2021).

7. Takaaki Tsunematsu, Natsumi Fujiwara, Maki Yoshida, Yukihiro Takayama, Satoko Kujiraoka, Guangying Qi, Masae Kitagawa, Tomoyuki Kondo, Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Mutsumi Miyauchi, Ikuko Ogawa, Yoshihiro Abiko, Hiroki Nikawa, Shinya Murakami, Takashi Takata, Naozumi Ishimaru, Yasusei Kudo. Human odontogenic epithelial cells derived from epithelial rests of Malassez possess stem cell properties // Laboratory investigation. 2016. volume 96. [Электронный ресурс]. URL:<https://www.nature.com/articles/labinvest201685> (дата обращения 10.07.2021).
8. A. Angelova Volponi, M. Kawasaki, P.T. Sharpe. Adult Human Gingival Epithelial Cells as a Source for Whole-tooth Bioengineering // Journal of Dental Research. 2013. volume 92, issue 4. [Электронный ресурс].  
URL: [https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034513481041?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034513481041?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed)  
(дата обращения 10.07.2021).
9. Kim Hynes, Stan Gronthos, P. Mark Bartold. iPSC for Dental Tissue Regeneration // Current Oral Health Reports. 2014. volume 1. [Электронный ресурс].  
URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40496-013-0001-8>  
(дата обращения 10.07.2021).
10. Xuefeng Hu, Jyh-Wei Lee, Xi Zheng, Junhua Zhang, Xin Lin, Yingnan Song, Bingmei Wang, Xiaoxiao Hu, Hao-Hueng Chang, Yiping Chen, Chun-Pin Lin, Yanding Zhang. Efficient induction of functional ameloblasts from human keratinocyte stem cells // Stem Cell Research & Therapy. 2018. volume 9. [Электронный ресурс]. URL: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-018-0822-4>  
(дата обращения 10.07.2021).