**Репаративное образование дентина белками дентинного матрикса и малыми внеклеточными пузырьками**

**Введение**

Ткань пульпы зуба, являющаяся единственной васкуляризированной соединительной тканью в зубе, играет важную роль в поддержании стабильности и здоровья зубов. Повреждение ткани пульпы может негативно сказываться на нормальном физиологическом функционировании и сохранности зуба [1\*]. На ранних стадиях инфицирования пульпы прямое и непрямое покрытие пульпы у молодых пациентов вызывает образование третичного минерализованного дентина для предотвращения некроза пульпы зуба, сохранения целостности и продления срока службы зубов [2\*]. В последнее время в качестве натуральных заменителей тканей дентина использовались цементы на основе силиката кальция (CSC) и гидроксид кальция (CH), стимулировавшие образование минерализованной ткани за счет выделения Ca2+ и щелочных продуктов [3\*]. Биологический ответ на современные средства для покрытия пульпы редко вызывает регенерацию тканей зуба и потому относится к репаративным процессам [4\*]. Исследования показали, что образованию реактивного дентина способствует секреция специфических факторов роста и биоактивных молекул, выделенных в оставшемся дентинном матриксе [5\*].

Текущие исследования подтвердили, что обработанный дентинный матрикс (TDM) содержит такие компоненты внеклеточного матрикса, как сиалопротеин дентина (DSP), белок-1 дентинного матрикса (DMP-1) и трансформирующий фактор роста-β (TGF- β), связанные с возникновением, образованием и минерализацией дентина. В сочетании с клетками зубных фолликулов обработанный дентинный матрикс может использоваться для создания биокорня как альтернатива дентальному имплантату при отсутствии зубов [6-8\*]. Исследования in vivo и in vitro показали, что по сравнению с гидроксидом кальция обработанный дентинный матрикс демонстрирует более высокую биологическую активность [9\*].

В случае инфицирования и/или травматических повреждений в пульпе молочных и постоянных зубов регенерация тканей дентинно-пульпарного комплекса происходит с участием стволовых клеток пульпы зуба (DPSC) [10\*]. Способность стволовых клеток пульпы дифференцироваться в одонтобластоподобные клетки, остеобласты и клетки-предшественники нейронов и другие клеточные линии может использоваться в клинической работе для регенерации пульпы [11\*]. Однако в настоящее время лечение с использованием стволовых клеток сталкивается с препятствиями в клинической и нормативной сферах, которые могут ограничить проведение дальнейших исследований и широкое клиническое применение [12\*]. Например, к таким препятствиям относятся подбор доноров, криоконсервация, пролиферация клеток.

На основании собранных данных известно, что малые внеклеточные везикулы (sEV) активно участвуют в межклеточной активности: переносе мРНК, миРНК и переносе белков, и играют важную роль в процессах иммуномодуляции, метастазировании рака и регенерации тканей [13\*]. Кроме того, малые внеклеточные везикулы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток (МСК), обладают характеристиками, схожими с мезенхимальными стволовыми клетками и способствуют регенерации тканей [14\*]. Малые внеклеточные везикулы, секретируемые стволовыми клетками пульпы зуба, могут способствовать дифференцировке одонтобластов, ослаблять апоптоз соседних клеток, оказывать нейропротекторный эффект и способствовать ангиогенезу [15-17\*].

**Цель**

Целью данного исследования было определение влияния белков обработанного дентинного матрикса и малых внеклеточных везикул клеток пульпы зуба (DPC) на поведение клеток пульпы зуба человека (hDPCs), включая миграцию, пролиферацию и дифференцировку одонтобластов, а также изучение влияния обработанного порошка дентинного матрикса в сочетании с малыми внеклеточными везикулами на обнаженную ткань пульпы и дентинно-пульпарный комплекс [6,7,9\*].

**Материалы и методы**

Препарат обработанного дентинного матрикса была получен путем химической деминерализации и механического разрушения зубов до порошкообразного состояния. Малые внеклеточные везикулы были выделены из культуральных супернатантов клеток пульпы зуба и идентифицированы с помощью анализа отслеживания наночастиц, вестерн-блоттинга и просвечивающей электронной микроскопии. Влияние комбинации обработанных белков дентинного матрикса и малых внеклеточных везикул клеток пульпы зуба на пролиферацию, миграцию и одонтогенную дифференциацию клеток пульпы оценивалось in vitro.

Для сравнения клинических результатов и реакций тканей в ответ на применение материалов использовались модели с имитацией повреждения пульпы, полученные из резцов миниатюрных свиней. Сравнение проводилось среди 4 материалов: обработанный дентинный матрикс (TDM), малые внеклеточные везикулы (sEV), комбинация малых внеклеточных везикул и обработанного дентинного матрикса (sEV-TDM), минерал триоксид агрегат (MTA).

**Результаты**

1. *Подготовка и характеристика обработанного дентинного матрикса*

После химической и механической обработки дентинный матрикс измельчали до состояния мелкодисперсного порошка (Рисунок 1А). На микрофотографиях, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ), на поверхности обработанного дентинного матрикса визуализировались отверстия дентинных канальцев, в то время как на обработанном порошке дентинного матрикса (TDMP) визуализировались частицы микронного размера без какой-либо структуры дентинных канальцев (Рисунок 2В). Концентрация белка в экстрактах обработанного дентинного матрикса свиньи (pTDM) составляла 1,71±0,31 мкг/мкл, в то время как концентрация белка в экстрактах обработанного дентинного матрикса человека (hTDM), составляла 1,85 ± 0,23 мкг/мкл (Рисунок 1C).

1. *Выделение, идентификация и характеристика клеток пульпы зуба*

Клетки пульпы зуба имели типичные веретенообразные морфологические характеристики мезенхимальных клеток и были положительно окрашены на виментин, маркер мезенхимальных стволовых клеток (Рисунок 2A). Потенциал дифференцировки клеток пульпы зуба человека был подтвержден адипогенной, остеогенной и нейрогенной индукцией с помощью окрашивания масляным красным, ализариновым красным и иммунофлуоресцентным окрашиванием нестина. Анализ проточной цитометрии показал, что клетки пульпы зуба человека были положительно окрашены на маркеры мезенхимальных стволовых клеток CD29, CD90, CD44, CD146, CD166 и отрицательно окрашены на маркеры гемопоэтических клеток CD33, CD34, CD45.

1. *Выделение и идентификация мелких внеклеточных везикул*

При просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) небольшие внеклеточные везикулы клеток пульпы зуба выглядели как круглые структуры с двойной мембранной. Размер малых внеклеточных везикул человека (hDPCs-sEV) и малых внеклеточных везикул свиньи (pDPCs-sEV) составлял от 50 до 150 нм в диаметре (Рисунок 2Б). Вестерн-блоттинг выявил присутствие в небольших внеклеточных везикулах белковых маркеров CD63, HSP70 и Alix (Рисунок 2С).

1. *Влияние малых внеклеточных везикул и обработанного дентинного матрикса (sEV-TDM) на пролиферацию и миграцию клеток*

Клетки пульпы зуба человека мигрировали через поликарбонатную мембрану (Рисунок 3A). По сравнению с контрольной группой экстракты обработанного матрикса дентина и малые внеклеточные везикулы способствовали миграции клеток пульпы зуба (0 мкг/мл). В группе sEV наблюдалось постепенное увеличение способности клеток к миграции, которое совпадало с увеличением концентрации малых внеклеточных везикул. Однако в группе sEV-TDM изменения концентрации мелких внеклеточных везикул практически не влияли на способность клеток к миграции (10 мкг/мл-200 мкг/мл).

Результаты пролиферации клеток пульпы зуба человека представлены на Рисунке 3В. По сравнению с контрольной группой способность к пролиферации была выше в среде, индуцированной малыми внеклеточными везикулами (0 мкг/мл). Высокая концентрация малых внеклеточных везикул (> 100 мкг/мл) не влияла на пролиферативную способность. Сочетание экстрактов обработанного дентинного матрикса TDM с индукцией sEV оказывали минимальное влияние на пролиферацию клеток. В группах экстрактов обработанного дентинного матрикса TDM, начиная с 4-го дня, при сохранении той же концентрации малых внеклеточных везикул не наблюдалось значительной пролиферации клеток.

1. *Влияние sEV-TDM на одонтогенную дифференцировку клеток пульпы зуба человека*

Эффекты sEV и sEV-TDM на уровне экспрессии РНК при одонтогенной дифференцировке клеток пульпы зуба человека представлены на Рисунке 3C. Индукция sEV-TDM (50 мкг/мл + TDM, 100 мкг/мл + TDM) усиливала экспрессию остеопонтина в клетках пульпы зуба человека по сравнению с контрольными образцами (0 мкг/мл). Изменения уровней RUNX2, DSPP, COL-I, ALP в группе sEV-TDM были незначительными (p> 0,05). Экстракты TDM (0 мкг/мл + TDM) значительно повышали уровни экспрессии DMP-1 (p <0,001) и OPN (p <0,01) клетками пульпы зуба человека по сравнению с контрольными образцами. В группе sEV экспрессия DMP-1 явно повышалась, тогда как экспрессия гена щелочной фосфатазы значительно снижалась при концентрации 100 мкг/мл (p <0,001), экспрессия RUNX2 повышалась при 50 мкг/мл (p <0,05). Уровни экспрессии белков, связанных с одонтобластами, после sEV-TDM показаны на Рисунке 3D. Было обнаружено, что малые внеклеточные везикулы (50 мкг/мл, 100 мкг/мл) усиливали экспрессию DMP-1, DSPP и RUNX-2 по сравнению с контрольной группой (0 мкг/мл). SEV-TDM умеренно подавлял экспрессию RUNX2 (p> 0,05) и значительно повышал экспрессию DSPP (p <0,01) и DMP-1 (p <0,01) в клетках пульпы зуба человека.

1. *Покрытие пульпы материалом sEV-TDM у миниатюрных свиней*

Модели с покрытием пульпы и герметизацией стеклоиономерным цементом через шесть недель оставались интактными. На перфорации в группах TDM, sEV-TDM и MTA наблюдалось затемнение высокой плотности. В группе sEV отмечалась неполная минерализация дентина (Рисунок 4a-d). Слои минерализованного дентина в группе MTA были толще, чем в группах TDM и sEV-TDM. Среди групп TDM, sEV-TDM и MTA не было обнаружено статистически значимых различий в толщине твердых тканей (p> 0,05).

Однако в 4 образцах из группы sEV, в которых не смогли закрыть перфорацию, наблюдалась неполная минерализация тканей. В других 5 образцах группы sEV не было обнаружено явно минерализованной ткани.

Гистологический анализ показал полную регенерацию дентинного мостика и третичного дентина в группах TDM, sEV-TDM и MTA, за исключением группы sEV (Рисунок 4 e-t). В группах TDM и sEV-TDM в ткани пульпы зуба рядом с дентинным мостиком наблюдались поляризующие и высокие столбчатые одонтобластоподобные клетки (Рисунок 4A и B). Репаративный дентин группы MTA оказался близко к остеоидному дентину, клетки имели форму куба или короткого столбика (Рисунок 4D). В группе sEV репаративный слой дентина был недостаточно минерализован. Более того, в тканях пульпы наблюдалась воспалительная реакция в виде разрастания фиброзной ткани (Рисунок 4С).

Рисунок 1. Изготовление обработанного дентинного матрикса TDM

****

А. Из извлеченного зуба приготовлен обработанный дентинный матрикс, который после растирания использован для приготовления водных экстрактов TDM.

B. Морфология поверхности TDM и TDMP при наблюдении с помощью СЭМ.

C. Концентрация белка при экстракции обработанного дентинного матрикса свиньи и экстракции обработанного дентинного матрикса человека.

Рисунок 2. Выделение и идентификация клеток пульпы зуба и малых внеклеточных везикул

****

A. Культура и идентификация клеток пульпы зуба. Клетки пульпы зуба с характерными морфологическими характеристиками мезенхимальных клеток (a,b). Клетки пульпы зуба позитивно окрашены на виментин (c) и отрицательно для CK-14 (d).

B. Идентификация малых внеклеточных везикул с помощью просвечивающей электронной микроскопии (a,c). Распределение размеров малых внеклеточных везикул с помощью анализа отслеживания наночастиц (b,d).

C. Экспрессию маркированных белков в малых внеклеточных везикулах определяли вестерн-блоттингом CD63, HSP70, Alix.

D. Эндоцитоз мелких внеклеточных пузырьков клетками пульпы зуба. Ядро клетки визуализируется ядерным маркером DAPI (синий, a,d). Цитоскелет визуализировали с помощью фаллоидина (красный, b,f). Малые внеклеточные везикулы визуализируются с помощью DiO (зеленый, c,g).

Рисунок 3. Влияние sEV-TDM на клетки пульпы зуба in vitro

****

A. Миграция клеток пульпы зуба через поликарбонатную мембрану в группе sEV и группе sEV-TDM при различных концентрациях малых внеклеточных везикул.

B. Пролиферация клеток пульпы зуба после лечения малыми внеклеточными везикулами в группе питательной среды α-MEM и группе TDM.

C. Уровни мРНК генов маркеров одонтогенной дифференцировки DSPP, DMP-1, ALP, COL-I, OPN и RUNX-2 после обработки группой α-MEM и группой TDM посредством различных концентраций sEV.

D. Белки DSPP, DMP-1, ALP, OPN и RUNX-2 выражают притяжение обработанного дентинного матрикса и небольших внеклеточных везикул.

Рисунок 4. Оценка in vivo материала sEV-TDM для покрытия пульпы на миниатюрных свиньях

****

A. Группа TDM

B. Группа sEV-TDM

C. Группа sEV

D. Группа MTA

a-d. Изображения микро-КТ

e-l. Окрашивание HE и по Массону (mt) через 6 недель после прямого покрытия пульпы показали, что полное формирование дентинного мостика произошло в группе TDM, группе sEV-TDM и группе MTA, но не в группе sEV

D - дентин; P - ткань пульпы; DB - мостовидный протез.

**Вывод**

Таким образом, это исследование показало, что sEV-TDM эффективно задействует клетки пульпы зуба, индуцирует дентиногенез и стимулирует образование реактивного дентина. Одонтогенная индуктивность sEV-TDM выше, чем у MTA. Таким образом, sEV-TDM рекомендуется для использования в качестве биоактивного материала для покрытия витальной пульпы.

\*Указатели ссылок в квадратных скобках соответствуют списку литературы в первоисточнике.