УДК 57.085.23+576..5+616.314.18-076.5+576.32/.36+576.385.5+576.364

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ИЗ ПУЛЬПЫ ЗУБА: ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА

© Павел Эдуардович Лазарев, Альбина Сергеевна Могилева, Михаил Сергеевич Некрасов, Сарнг Саналович Пюрвеев, Евгений Александрович Лебеденко, Яна Олеговна Карабасова, Руслан Иванович Глушаков

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2

Контактная информация: Павел Эдуардович Лазарев — студент 3 курса, педиатрический факультет. E-mail: drlazarev78@gmail.com

Поступила: 03.02.2021 **Одобрена: 11.03.2021** **Принята к печати: 24.03.2021**

РЕЗЮМЕ: Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) имеют широкий спектр возможности применения в медицине, при этом их источником традиционно является костный мозг. В настоящей статье рассматриваются свойства стволовых клеток, полученных из пульпы зуба, оценивается их иммунофенотипическое соответствие клеткам из костного мозга. Фенотипирование клеток проводили методом проточной цитометрии с помощью специфических маркеров экспрессии поверхностных антигенов, которые подтверждали соответствие фенотипа исследуемых клеток культурам МСК. Оценивается также способность к хондрогенной и остеогенной дифференцировке в условиях *in vitro* с последующей окраской для подтверждения ее успешного завершения. В результате проведенного иммуноцитохимического исследования на экспрессию поверхностных маркерных белков CD90, CD105, CD73, CD44, CD45, CD14, CD117, CD34 было подтверждено соответствие фенотипа исследуемых клеток культурам МСК. Экспрессия CD34, CD45, характерная для гемопоэтических стволовых клеток, в исследуемых культурах не наблюдалась. Дифференцировку клеток одной из проб запустили в ростовых средах в культуральном шестилуночном планшете и культивировали в течение 21 дня; на 22-й день оценивали дифференцировку клеток. Для выявления хондрогенной дифференцировки клетки окрашивали альциановым синим, а для остеогенной дифференцировки — ализариновым красным, что по специфической окраске позволяло визуализировать соответствующие структуры и подтверждать процессы клеточной дифференцировки. По результатам морфологического исследования стволовые клетки, содержащиеся в пульпе зуба, соответствуют по морфологии и иммунофенотипу МСК, полученным из костного мозга и пупочного канатика. МСК, полученные из пульпы зуба, перспективно использовать в травматологии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии, а также при лечении термических поражений и различных заболеваниях (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет 1-го типа и т.д.), при этом стволовые клетки можно выделять не только из пульпы молочных зубов, но и из пульпы постоянных при экстракции зуба по показаниям ортодонта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стволовые клетки; пульпа зуба; проточная цитометрия; иммунофенотип; дифференцировка.

STEM CELLS FROM TOOTH PULP: IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERISTICS AND DIFFERENTIATION

© Pavel E. Lazarev, Albina S. Mogileva, Mikhail S. Nekrasov, Sarng S. Purveev, Evgeniy A. Lebedenko, Yana O. Karabasova, Ruslan I. Glushakov

Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Russia, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

Contact information: Pavel E. Lazarev — 3rd year student, faculty of pediatrics. E-mail: drlazarev78@gmail.com

Received: 03.02.2021 **Revised: 11.03.2021** **Accepted: 24.03.2021**

ABSTRACT: Mesenchymal stem cells have a wide range of applications in medicine; traditionally, bone marrow is their source. This article discusses the properties of stem cells derived from tooth pulp, evaluates their immunophenotypic correspondence to cells from bone marrow. The methods are a cytometer study of the expression of surface antigens that confirm the phenotype of the studied cells according to the cultures of mesenchymal stem cells, the ability to chondrogenic and osteogenic differentiation in vitro is also evaluated, followed by staining to confirm its successful completion. As a result of an immunocytochemical study on the expression of surface marker proteins CD90, CD105, CD73, CD44, CD45, CD14, CD117, CD34, the phenotype of the studied cells was confirmed to correspond to mesenchymal stem cell cultures. Expression of CD34, CD45, characteristic of hematopoietic stem cells, was not observed in the studied cultures. The differentiation of the cells of one of the samples was started in growth media in a culture 6 well plate and cultured for 21 days. On day 22, differentiation was evaluated. To detect chondrogenic differentiation, cells were stained with Alcian blue, and for osteogenic differentiation, they were stained with Alizarin red, which stained the corresponding structures, which confirmed the successful differentiation. Thus, the stem cells contained in the pulp of the tooth correspond according to the morphology and immunophenotype of MSCs from the bone marrow and umbilical cord. That confirms the possibility of their use on a par with MSCs from other sources. MSCs from tooth pulp can be used in traumatology, maxillofacial surgery, dentistry, as well as in the treatment of burn wounds and various diseases (Parkinson's disease, Alzheimer's disease, diabetes mellitus, etc.). Stem cells can be isolated not only from the pulp of deciduous teeth, but also from the pulp of constants during tooth extraction according to the indications of the orthodontist.

KEY WORDS: stem cells; tooth pulp; flow cytometry; immunophenotype; differentiation.

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) — это клетки, являющиеся предшественниками целого ряда клеток различных тканей. Они содержатся в костном мозге, жировой ткани, а также в зубной пульпе. Зубная пульпа — это ткань, формирующая внутреннюю структуру зуба; в ней содержатся стволовые клетки, которые могут дифференцироваться в клетки жировой, костной, мышечной, хрящевой и нервной тканей. Наличие этого свойства у МСК нашло применение в медицине при лечении разных заболеваний и патологий (сахарный диабет 1-го типа, цирроз печени, травмы, ортопедические патологии и т.д.), а также в реконструктивной хирургии и трансплантологии. Такой широкий спектр применения МКС обусловлен их способностью подавлять воспалительные процессы, усиливать пролиферацию клеток в месте трансплантации, стимулировать рост сосудов. Важным преимуществом данных клеток является возможность их культивирования *in vitro*, что позволяет значительно увеличивать их количество и дает возможности для исследования этих клеток. Традиционно основным источником МСК является костный мозг, но в настоящее время метод получения стволовых клеток из альтернативных источников приобретает популярность [2, 6, 10]. Выделенные МСК из пульпы зуба также можно применять при лечении разных заболеваний и патологий.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение свойств стволовых клеток, полученных из пульпы зуба, и сравнение их с мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из других источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для нашего исследования послужили МСК из пульпы молочного зуба, предоставленные Покровским банком стволовых клеток. Перед началом исследования клетки культивировали в стандартных условиях, меняя культуральную среду раз в три дня. Затем запустили хондрогенную и остеогенную дифференцировку клеток одной из проб в росто-

вых средах в культуральном шестилуночном планшете и культивировали в течение 21 дня. На 22-й день дифференцировку оценили.

Выявление дифференцировки. Непосредственно перед исследованием клетки зафиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 минут. После этого клетки отмывали PBS 2 раза. Для выявления хондрогенной дифференцировки клетки окрашивали альциановым синим, а для остеогенной дифференцировки — ализариновым красным. Инкубация после окрашивания длилась 45 минут при температуре +4 °C. Затем клетки промыли водой 2 раза и оставили в водном растворе для анализа. Окрашенные клетки просматривали на инвертированном световом микроскопе.

Проточная цитофлуориметрия. Принцип метода проточной цитометрии основан на регистрации флюоресценции и светорассеяния от каждой отдельно взятой клетки в клеточной суспензии. Клетки одна за другой проходят через тонкий капилляр, облучаются лазерным лучом, при этом регистрируется флюоресценция и рассеянное лазерное излучение каждой клетки. Полученный сигнал передается на компьютер, обрабатывается, и полученные данные отображаются в виде различных графиков и гистограмм [1].

Отдельная проба клеток была использована для анализа на проточном цитометре. В культуральный матрац добавили трипсин для смыва клеток с твердой подложки в суспензию. Затем клетки отмыли от трипсина с помощью PBS. Пробу разделили на три пробирки, в полученную суспензию клеток вносили моноколональные антитела, меченные флуоресцентными красителями: флуоресцеином–изотиоционатом (FITC), фикоэритрином (PE), фикоэритрином–цианином 5 (PC 5), фикоэритрином–цианином 7 (PC 7). Для выявления жизнеспособности клеток пробу окрашивали пропидия йодидом (PI). Затем потребовалась инкубация клеток в темноте после окрашивания в течение 20 минут. Далее в каждую пробу внесли по 4 мл PBS и вортексировали. Пробирки центрифугировали в течение 7 минут. Сливали супернатант и доводили PBS до 200 мкл. Исследование выполняли на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты дифференцировки клеток

В результате окрашивания клеток альциановым синим (хондрогенная дифференцировка) и ализариновым красным (остеогенная дифференцировка) в соответствующих лунках культурального планшета визуализированы соответствующие клеточные структуры, что подтверждало успешную хондрогенную и остеогенную дифференцировку МСК, выделенных из пульпы зуба (рис. 1–3).

Результаты проточной цитометрии

Исследование выполняли на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter, USA) на базе Покровского банка стволовых клеток. Уровень жизнеспособности исследуе-

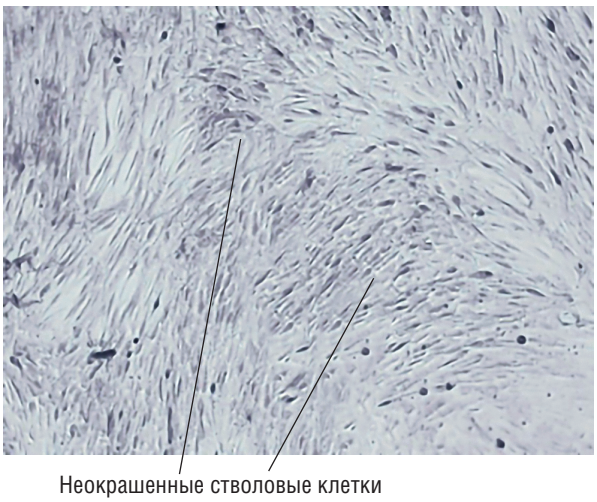

Рис. 1. Нативная культура МСК из пульпы молочного зуба (микрофотография, без окраски, ×80)

Fig. 1. The native culture of MSCs from the pulp of a milk tooth (microphotography, unpainted, ×80)

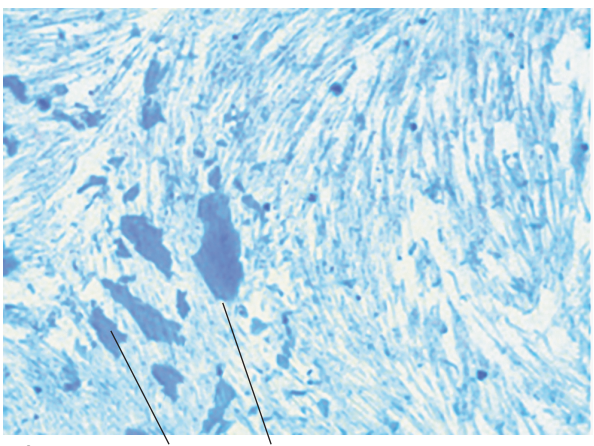

Рис. 2. Хондрогенная дифференцировка. Альциановый синий связывается с мукополисахаридами (микрофотография, окраска альциановым синим, ×80)

Fig. 2. Chondrogenic differentiation. Alcian blue binds to mucopolysaccharides (microphotography, alcian blue, ×80)

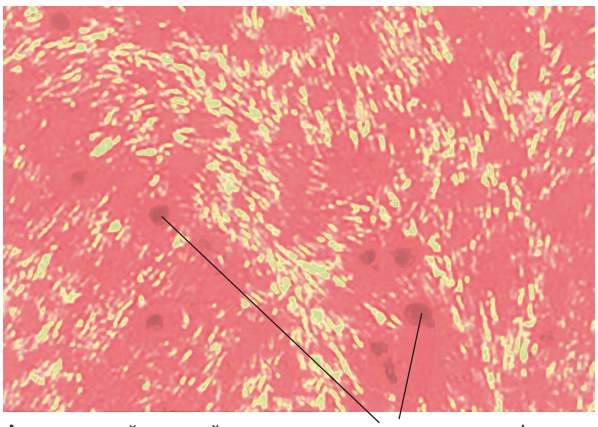

Рис. 3. Остеогенная дифференцировка. Ализариновый красный связывается с центрами кальцификации (микрофотография, окраска ализариновым красным, ×80)

Fig. 3. Osteogenic differentiation. Alizarin red binds to calcification centers (microphotography, alizarin red, ×80)

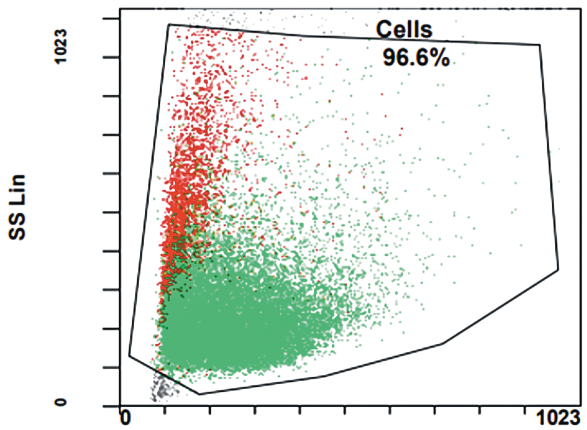

Рис. 4. Жизнеспособность клеток составила более 95%. Для выявления жизнеспособности клеток пробу окрашивали пропидия йодидом

Fig. 4. Cell viability was over 95%. To identify cell viability, the sample was stained with propidium iodide

мого образца довольно высокий и составляет более 95% живых клеток (рис. 4).

Полученные культуры клеток были исследованы на экспрессию поверхностных маркерных белков CD90, CD105, CD73, CD44,CD45, CD14, CD117, CD34.

Экспрессия CD34, CD45, характерная для гемопоэтических стволовых клеток, в исследуемых культурах не наблюдалась (рис. 5, 6).

Экспрессия CD14 присутствует в незначительном количестве (3,5%) (рис. 7).

Экспрессия CD117, характерная для опухолевых клеток, также отсутствовала в исследуемых образцах (рис. 8).

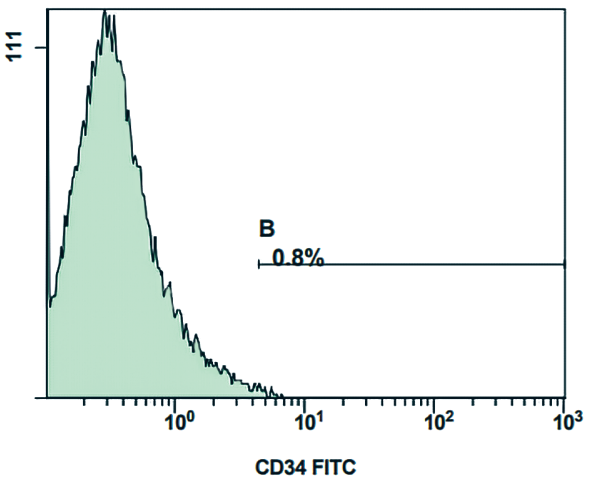

Рис. 5. Экспрессия CD34

Fig. 5. Expression of CD34

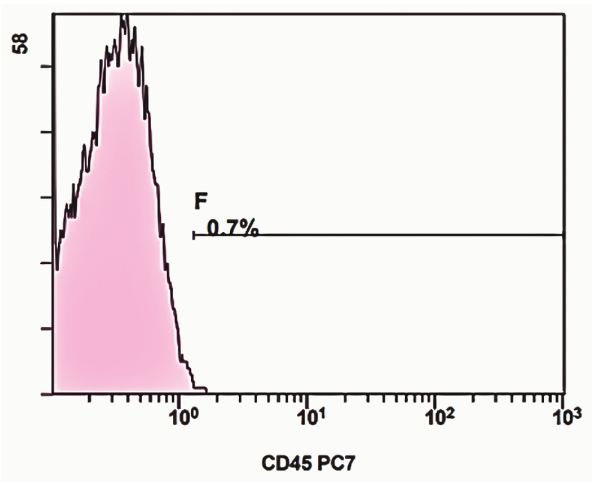

Рис. 6. Экспрессия CD45

Fig. 6. Expression of CD45

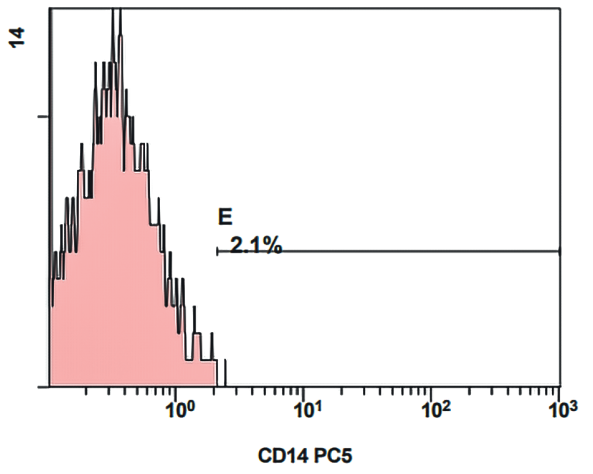

Рис. 7. Экспрессия CD14

Fig. 7. Expression of CD14

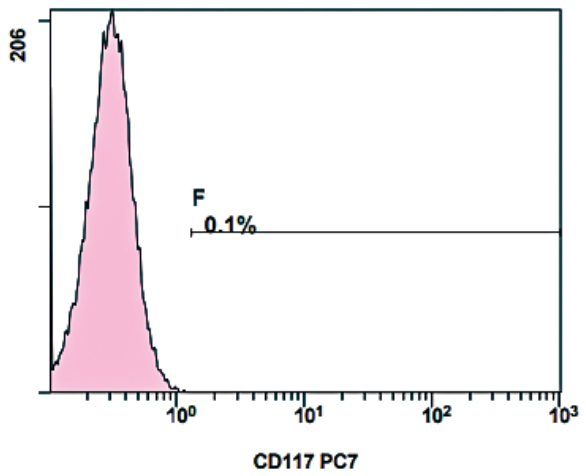

Рис. 8. Экспрессия CD117
Fig. 8. Expression of CD17

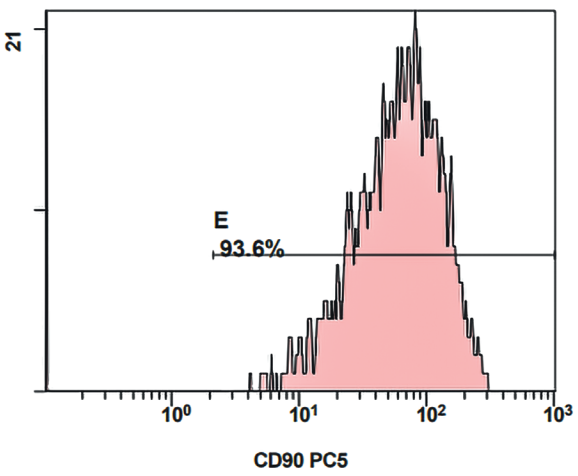

Рис. 11. Экспрессия CD90
Fig. 11. Expression of CD90

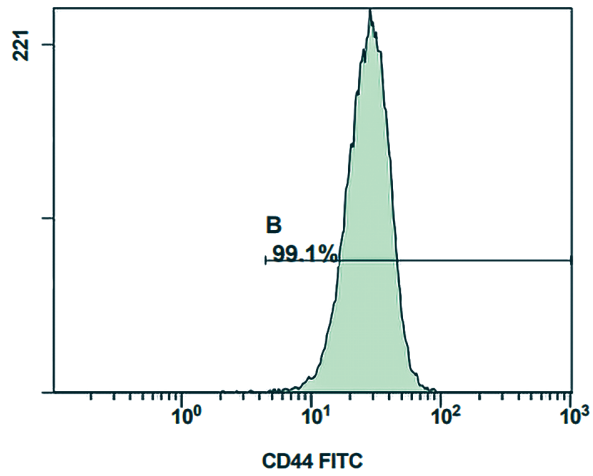

Рис. 9. Экспрессия CD44
Fig. 9. Expression of CD44

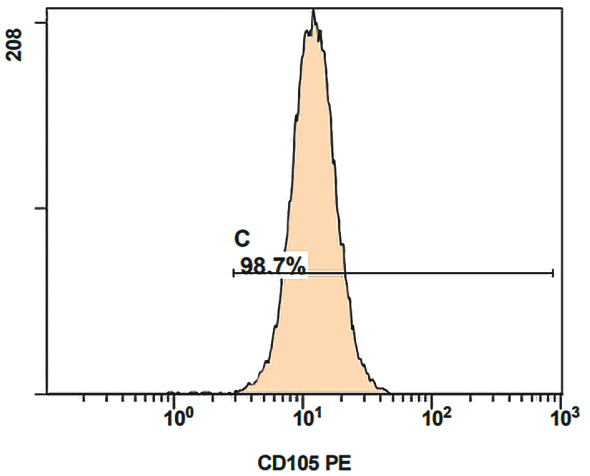

Рис. 12. Экспрессия CD105
Fig. 12. Expression of CD105

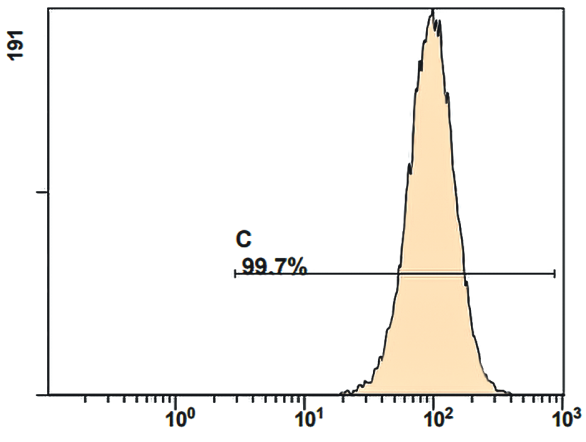

Рис. 10. Экспрессия CD73
Fig. 10. Expression of CD73

Экспрессия CD90, CD105, CD73, CD44 характеризуется высоким уровнем в исследуемых клетках. CD90, CD105, CD73, CD44 являются поверхностными белками мультипотентных клеток мезенхимального ряда (рис. 9–12).

Их уровень экспрессии соответствует МСК из костного мозга и пупочного канатика.

Таким образом, в результате проведенного иммуноцитохимического исследования было подтверждено соответствие фенотипа исследуемых клеток культурам МСК.

Окрашивание подтвердило успешную хондрогенную и остеогенную дифференцировку.

Исследованием на цитометре подтверждено соответствие фенотипа исследуемых клеток культурам МСК.

ВЫВОДЫ

Стволовые клетки, содержащиеся в пульпе зуба, соответствуют по морфологии и иммунофенотипу МСК из костного мозга и пупочного канатика. Таким образом, это подтверждает возможность их использования наравне с МСК из других источников.

Следовательно, МСК из пульпы зуба могут применяться в травматологии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии, лечении ожоговых ран и при лечении других различных заболеваний (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет 1-го типа и т.д.) [5–9].

Стволовые клетки можно выделить не только из пульпы молочных зубов, но также и из пульпы постоянных при удалении зуба по показаниям ортодонта. Такие стволовые клетки можно заготавливать во время смены молочных зубов (или при удалении зуба) и хранить в криобанке для дальнейшего использования. Заготовленные клетки подойдут не только «хозяину» зуба, но и всем его родственникам. [3, 4].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность генеральному директору Покровского банка стволовых клеток Ш.Ф. Адылову и сотруднику В. Багаевой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев В.В., Алипов А.Н., Андреев В.А. и др. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике в 2-х томах. 3-е издание, дополненное и переработанное. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013; 2.
2. Астахов М., Галонжка Ж. Исследование влияния частиц оксида железа на мезенхимальные стволовые клетки пупочного канатика человека. Материалы Всероссийского научного форума студентов с международным участием «Студенческая наука-2019». Forcipe. 2019; 2: 538–9.
3. Бакунина Н.С., Глушаков Р.И., Тапильская Н.И., Шабанов П.Д. Фармакология полипренолов как адаптогенов, снижающих интенсивность процессов гликирования. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2013; 11(4): 44–53.
4. Жукова Л.В., Тапильская Н.И., Хацкевич Г.А. Роль хламидийной инфекции в заболеваниях пародонта. Институт стоматологии. 1999; 3(4): 32–33.
5. Зиновьев Е.В., Юдин В.Е., Асадулаев М.С. и др. Опыт применения стволовых клеток при лечении ожогов кожи. Педиатр. 2018; 9(4): 12–27. DOI: 10.17816/PED9412-7.
6. Cooper L.F. The current and future treatment of edentulism. Journal of Prosthodontics. 2009; 18(2): 116–22. DOI: 10.1111/j.1532-849X.2009.00441.x.
7. Monteiro N., Smith E.E., Angstadt S. et al. Dental Cell Sheet. Biomimetic Tooth Bud Model, Biomaterials. 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.024.
8. Huang G.T., Gronthos S., Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res. 2009; 88: 792–806.
9. Ravindran S., George A. Biomimetic extracellular matrix mediated somatic stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. Front Physiol. 2015; 6: 118. DOI: 10.3389/fphys.2015.00118.
10. Monteiro N., Yelick P. Advances and Perspectives in Tooth Tissue Engineering. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2016: Ahead of print. DOI: 10.1002/term.2134.
11. Monteiro N., Yelick P. Alveolar complex regeneration. In: Tolstunov L., editor. Horizontal Alveolar Ridge Augmentation in Implant Dentistry: A Surgical Manual: Wiley-Blackwell; 2015.
12. Young C.S., Terada S., Vacanti J.P. et al. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. Journal of Dental Research. 2002; 81 (10): 695–700. DOI: 10.1177/154405910208101008.

REFERENCES

1. Alekseyev V.V., Alipov A.N., Andreyev V.A. i dr. Meditsinskiye laboratornyye tekhnologii. [Medical laboratory technologies]. Rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoy diagnostike v 2-kh tomakh. 3-ye izdaniye, dopolnennoye i pererabotannoye. M.: GEOTAR-Media Publ. 2013; 2. (in Russian)
2. Astakhov M., Galonzhka ZH. Issledovaniye vliyaniya chastits oksida zheleza na mezenkhimal'nyye stvolovyye kletki pupochnogo kanatika cheloveka. [Investigation of the effect of iron oxide particles on mesenchymal stem cells of the human umbilical cord]. Materialy vserossiyskogo nauchnogo foruma studentov s mezhdunarodnym uchastiyem «Studencheskaya nauka–2019». Forcipe. 2019; 2: 538–9. (in Russian)
3. Bakunina N.S., Glushakov R.I., Tapil'skaya N.I., Shabanov P.D. Farmakologiya poliprenolov kak adaptogenov, snizhayushchikh intensivnost' protsessov glikirovaniya. [Pharmacology of polyprenols as adaptogens that reduce the intensity of glycation processes]. Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii. 2013; 11(4): 44–53. (in Russian)
4. Zhukova L.V., Tapil'skaya N.I., Khatskevich G.A. Rol' khlamidiynoy infektsii v zabolevaniyakh parodonta. [The role of chlamydial infection in periodontal disease]. Institut stomatologii. 1999; 3(4): 32–33. (in Russian)

5. Zinov'yev Ye.V., Yudin V.Ye., Asadulayev M.S. i dr. Opyt primeneniya stvolovykh kletok pri lechenii ozhogov kozhi. [Experience in the use of stem cells in the treatment of skin burns]. Pediatr. 2018; 9(4): 12–27. DOI: 10.17816/PED9412-27 (in Russian)
6. Cooper L.F. The current and future treatment of edentulism. Journal of Prosthodontics. 2009; 18(2): 116–22. DOI: 10.1111/j.1532-849X.2009.00441.x.
7. Monteiro N., Smith E.E., Angstadt S. et al. Dental Cell Sheet. Biomimetic Tooth Bud Model, Biomaterials. 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.024.
8. Huang G.T., Gronthos S., Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res. 2009; 88: 792–806.
9. Monteiro N., Yelick P. Advances and Perspectives in Tooth Tissue Engineering. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2016: Ahead of print. DOI: 10.1002/term.2134.
10. Monteiro N., Yelick P. Alveolar complex regeneration. In: Tolstunov L., editor. Horizontal Alveolar Ridge Augmentation in Implant Dentistry: A Surgical Manual: Wiley-Blackwell; 2015.
11. Ravindran S., George A. Biomimetic extracellular matrix mediated somatic stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. Front Physiol. 2015; 6: 118. DOI: 10.3389/fphys.2015.00118.
12. Young C.S., Terada S., Vacanti J.P. et al. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. Journal of Dental Research. 2002; 81 (10): 695–700. DOI: 10.1177/154405910208101008.