

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-4-29-48>



# Разработка подходов к использованию клеточнозаселенных гелеобразных скаффолдов для эндодонтического лечения методами регенеративной медицины

Ю.А. Домбровская<sup>1</sup>, Н.И. Енукашвили<sup>1,2</sup>, Н.Ю. Семенова<sup>3,4</sup>, В.В. Багаева<sup>1,5</sup>,  
Д.Ю. Акимов<sup>6</sup>, Н.А. Филиппова<sup>6</sup>, Е.А. Румянцева<sup>2</sup>, М.И. Котов<sup>1</sup>, О.Ю. Досаева<sup>1</sup>,  
А.А. Саханов<sup>1</sup>, О.Н. Кравец<sup>1</sup>, Е.М. Приходько<sup>1,5</sup>, А.В. Силин<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41
- <sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук, Россия, 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4
- <sup>3</sup> ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Россия, 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16
- <sup>4</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2
- <sup>5</sup> Центр клеточных технологий «Покровский». Россия, 199106, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., д. 85
- <sup>6</sup> АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Россия, 188663, Ленинградская область, п.г.т. Кузьмолковский, ул. Заводская, д. 3, корп. 245

Адреса для корреспонденции: [Yuliya.Dombrovskaya@szgmu.ru](mailto:Yuliya.Dombrovskaya@szgmu.ru), [n.enukashvily@incras.ru](mailto:n.enukashvily@incras.ru)

## Аннотация

Регенеративная эндодонтия — комплекс мер, направленных на восстановление пульпы или хотя бы формирование пульпоподобной ткани, в идеале — пульпо-дентинного комплекса; на регенерацию поврежденного коронального дентина, резорбированного корневого, цервикального или апикального дентина. Стратегии регенеративной эндодонтии включают трансплантацию стволовых клеток и регенеративные эндодонтические процедуры (regenerative endodontic procedures, REP). В настоящее время методы REP применяются при эндодонтическом лечении несформированных зубов у пациентов в возрасте 7–10 лет и направлены преимущественно на замену, а не восстановление поврежденной ткани пульпы. **Цель исследования:** отработка метода и оценка эффективности использования стволовых клеток пульпы зуба в сочетании с фибриновым гелем при эндодонтическом лечении сформированных зубов на животной модели — карликовой свинье. **Материалы и методы.** Исследование выполнено на половозрелых карликовых свиньях. Под общей анестезией (ксилазин и тилетамин-золазепам) животным было выполнено рентгенографическое обследование ротовой полости для выбора зуба, максимально схожего с человеческим по положению в челюстной дуге, количеству и форме корней и каналов. Был выбран первый левый жевательный интактный двух-

корневой зуб (P2) и проведена ампутация коронковой части и экстирпация корневой пульпы. Полости каналов были заполнены фибриновым гелем, содержащим аллогенные стволовые клетки пульпы зуба свиньи. Для полимеризации гель смешивали с катализаторами полимеризации фибриногена в фибрин (тромбин, хлорид кальция) непосредственно перед введением в каналы. Таким образом, гель (3 мкл, 15 000–18 000 клеток/канал) при полимеризации и отверждении принимал форму канала. Далее проведена изоляция геля минеральным триоксидным агрегатом и выполнена пломбировка коронковой части упрочненным пакуемым стеклоиономерным цементом химического отверждения. Через 4 месяца после эндодонтического лечения зуб удаляли, фиксировали, декальцинировали и использовали для стандартного гистологического исследования — изготавливали ступенчатые серийные срезы толщиной 3–5 мкм и окрашивали гематоксилином-эозином. Для количественной оценки отобрали семь срезов на разных уровнях с шагом 10 мкм, сканировали изображение и проводили морфометрические подсчеты. Оценивали абсолютные и относительные значения длин и площадей, а также степень васкуляризации. **Результаты исследования.** Длина, форма и объем корневых каналов первого левого жевательного двухкорневого зуба (P2) схожи с таковыми у человека, что позволило использовать при эндодонтическом лечении подходы и оборудование, разработанное для человека, что повышает релевантность модели. На гистологических срезах в апикальной части канала выявлено формирование васкуляризированной пульпоподобной стромальной ткани, а в средней и устьевой третях корня рядом с базофильными массами выявлены участки с палисадным слоем цилиндрических клеток — активных одонтобластов, продуцирующих дентин. В периапикальной области эндодонтически леченного зуба не зарегистрировано воспалительных процессов, а также отклонений в самочувствии животных и их пищевом поведении. **Заключение.** Полученные пилотные результаты свидетельствуют о перспективе развития методов регенеративной эндодонтии для лечения постоянных зубов со сформированными корнями. Скаффолды на основе фибринового геля и стволовых клеток пульпы зуба в целом подходят для целей регенеративной эндодонтии, однако необходима доработка метода с целью формирования архитектоники пульпы.

**Ключевые слова:** регенеративная эндодонтия, стволовые клетки пульпы зуба, карликовая свинья, скаффолды, тканевая инженерия, фибриновый гель

**Благодарности:** работа выполнена в рамках НИР 125061106974-4 Государственного задания Минздрава России «Разработка клеточнозаселенных твердых резорбируемых скаффолдов для восстановления костной ткани».

Коллектив авторов благодарит Котову Анастасию Викторовну за помощь при подготовке криопреципитата из крови карликовой свиньи, Супильникову Ольгу Владимировну за поддержание работы лаборатории.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Домбровская Ю.А., Енукашвили Н.И., Семенова Н.Ю., Багаева В.В., Акимов Д.Ю., Филиппова Н.А., Румянцева Е.А., Котов М.И., Досаева О.Ю., Саханов А.А., Кравец О.Н., Приходько Е.М., Силин А.В. Разработка подходов к использованию клеточнозаселенных гелеобразных скаффолдов для эндодонтического лечения методами регенеративной медицины. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(4):29–48. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-4-29-48>

Поступила 09.12.2024

Обработана 12.12.2024

Принята к публикации 19.12.2024

# Fibrin gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells for regenerative endodontic treatment: A pilot study

Yulia A. Dombrovskaya<sup>1</sup>, Natella I. Enukeashvily<sup>1,2</sup>, Natalia Yu. Semenova<sup>3,4</sup>,  
Varvara V. Bagaeva<sup>1,5</sup>, Dmitry Yu. Akimov<sup>6</sup>, Natalia A. Filippova<sup>6</sup>,  
Elisaveta A. Rumyantseva<sup>2</sup>, Mikhail I. Kotov<sup>1</sup>, Olesya Yu. Dosaeva<sup>1</sup>,  
Anton A. Sakhanov<sup>1</sup>, Olga N. Kravets<sup>1</sup>, Egor M. Prikhodko<sup>1,5</sup>, Alexey V. Silin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Russia, 191015, St. Petersburg, Kirochnaya str., 41

<sup>2</sup> Institute of Cytology Russian Academy of Science, Russia, 194064, St. Petersburg, Tikhoretsky ave., 4

<sup>3</sup> Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency, Russia, 191024, St. Petersburg, 2 Sovetskaya str., 16

<sup>4</sup> V.A. Almazov National Medical Research Center. Russia, 197341, St. Petersburg, Akkuratova str., 2

<sup>5</sup> Cell Technologies Center “Pokrovsky”, Russia, 199106, St. Petersburg, Bolshoy ave. V.I., 85

<sup>6</sup> Research and Manufacturing center “Home of Pharmacy”, Russia, 188663, Leningrad region, Kuzmolovsky, Zavodskaya str., 3, bldg. 245

E-mails for correspondence: [Yuliya.Dombrovskaya@szgmu.ru](mailto:Yuliya.Dombrovskaya@szgmu.ru), [n.enukashvily@incras.ru](mailto:n.enukashvily@incras.ru)

## Annotation

Regenerative endodontics is a strategy aimed at the regeneration of dental pulp or at least the formation of pulp-like tissue, ideally the pulp-dentin complex; regeneration of damaged coronal dentin, resorbed root, cervical or apical dentin. Regenerative endodontic strategies include stem cell transplantation and regenerative endodontic procedures (REP). REP methods are currently used in the endodontic treatment of open-apice teeth in patients aged 7–10 years. The most likely outcome of this treatment is repair (“maturation”) of the root, rather than regeneration of its tissues. **Aim of the study:** to develop the method and evaluate the efficacy of dental pulp stem cells in combination with fibrin gel for regenerative endodontic treatment of mature permanent teeth in a large animal model. **Materials and methods.** The study was conducted on minipigs. While under general anesthesia (xylazine and tiletamine-zolazepam), the animals underwent an X-ray examination of their oral cavities. This examination was performed to select a tooth that most closely resembled a human tooth in terms of its position in the jaw arch, as well as the number and shape of its roots and canals. The first left two-rooted molar (P2) was selected. The crown pulp was amputated, and the root pulp was extirpated. The canals were then filled with fibrin gel containing allogeneic pig dental stem cells. The gel was mixed with fibrinogen polymerization catalysts (thrombin and calcium chloride) immediately before being injected into the canals for polymerization. Thus, the gel (3  $\mu$ L, containing 15,000–18,000 cells per canal) took the shape of the canal during polymerization. Next, the gel was isolated with mineral trioxide aggregate, and the crown was filled with chemically cured, reinforced, packable glass ionomer cement. Four months after the endodontic treatment, the tooth was removed, fixed, decalcified, and used for a standard histological examination. Stepwise serial sections, 3–5  $\mu$ m thick, were prepared and stained with hematoxylin and eosin. For quantitative assessment, seven sections were selected at different levels with a step of 10  $\mu$ m, the images were scanned, and morphometric calculations were performed. Absolute and relative values of lengths and areas were assessed, as well as the degree of vascularization. **Results.** The length, shape and volume of the root canals of the first left premolar (P2) are similar to those in humans, which allowed us to use approaches and equipment developed for the endodontic treatment of human teeth, thus increasing the relevance of the model. Histological sections in the apical part of the canal

showed the formation of vascularized pulp-like stromal tissue, and in the middle and apical thirds of the root, areas with a palisade layer of cylindrical cells — active odontoblasts producing dentin — were detected next to basophilic masses. There were no inflammatory processes in the periapical area of the endodontically treated tooth. No changes in the animals' well-being or eating behavior were observed. **Conclusion.** The results of the pilot study indicate the prospects for the development of regenerative endodontics methods for the treatment of mature permanent teeth with formed roots. Scaffolds based on fibrin gel and dental pulp stem cells are generally suitable for the purposes of regenerative endodontics, but the method needs to be further improved to form pulp architectonics.

**Keywords:** regenerative endodontics, regenerative endodontics procedures, dental pulp stem cells, minipig, large animal model, scaffolds, tissue engineering, fibrin gel

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Ministry of Health (State Assignment project 125061106974-4 “Development of Cell-Seeded Stiff Resorbable Scaffolds for Bone Tissue Restoration”).

The authors wish to thank A. V. Kotova for her work in preparing the minipig blood cryoprecipitate and O. V. Supilnikova for her ongoing efforts in maintaining the smooth functioning of our laboratory.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interests.

**For citation:** Dombrovskaya Yu.A., Erukashvily N.I., Semenova N.Yu., Bagaeva V.V., Aki-mov D.Yu., Filippova N.A., Rummyantseva E.A., Kotov M.I., Dosaeva O.Yu., Sakhanov A.A., Kravets O.N., Prikhodko E.M., Silin A.V. Fibrin gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells for regenerative endodontic treatment: A pilot study. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(4):29–48. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-4-29-48>

Received 09.12.2024

Revised 12.12.2024

Accepted 19.12.2024

Кариозный процесс, травма зубов, воспалительно-деструктивные заболевания тканей пародонта, некариозные поражения эмали и дентина могут привести к необратимым изменениям пульпы [1, 2]. При отсутствии лечения пульпит может привести к апикальному периодонтиту, абсцессу и, в конечном счете, потере зуба.

В настоящее время наиболее популярной стратегией терапии воспаления пульпы является эндодонтическое лечение, которое включает в себя в том числе очистку корневых каналов и их пломбирование биологически инертными материалами.

На ранних этапах развития воспаления в тканях пульпы существует возможность биологического метода лечения. Однако способность устранять воспаление для достижения предсказуемой регенерации комплекса «дентин — пульпа» остается недостижимой и представляет собой сложную задачу для врачей и исследователей. Данный комплекс может естественным образом реагиро-

вать на повреждение, формируя мостик из восстановительного дентина, однако этот процесс может нарушаться при сохранении воспаления. Поэтому при использовании биологических методов лечения крайне важно устранить воспалительные процессы в пульпе, чтобы создать микросреду, благоприятную для заживления и формирования дентинного мостика.

Разработка биологических методов лечения заболеваний пульпы привела к формированию новой дисциплины — регенеративной эндодонтии, использующей внутренние возможности репарации и/или регенерации с участием клеток пульпы и периапикального комплекса [3–5]. Под регенеративной эндодонтией понимают комплекс мер, направленных на восстановление пульпы или хотя бы формирование пульпоподобной ткани, в идеале — пульпо-дентинного комплекса; на регенерацию поврежденного коронального дентина, например после кариеса, а также резорбированного корневого, цервикального или апикального дентина [6].

В настоящее время стратегии регенеративной эндодонтии включают трансплантацию стволовых клеток и регенеративные эндодонтические процедуры (regenerative endodontic procedures, REP) [7]. При этом первый подход пока еще является экспериментальным и не входит в клинические рекомендации как в России, так и за рубежом. REP — это основанный на биологических методах клинически апробированный подход, включающий в настоящее время концепцию тканевой инженерии для замены (но не восстановления) поврежденных структур, включая дентин и клетки пульпо-дентинного комплекса [6], направленный не только на лечение пораженной верхушки корня и ликвидацию признаков и симптомов пульпита, но и на укрепление дентинных тканей для предотвращения потенциального перелома корня. Протоколы подобных процедур включают дезинфекцию канала противомикробными агентами, механическую стимуляцию кровотечения внутри эндодонтического пространства и рентгенологический мониторинг за дальнейшим развитием корней. В настоящее время такие подходы применяются при лечении несформировавшихся зубов, чаще всего у детей 7–10 лет. Конечной целью в теории является регенерация функционального пульпо-дентинного комплекса, восстановление иммунной компетентности и нормальной ноцицепции [7]. Однако такой результат не всегда достижим, и в качестве удовлетворительного исхода лечения рассматриваются исчезновение симптомов пульпита, утолщение стенки канала, закрытие верхушки корня. Регенерация пульпы и восстановление ноцицепции описаны преимущественно как отдельные клинические случаи у детей младше 10 лет [7, 8].

Поэтому в настоящее время очевидно, что регенеративная эндодонтия не должна ограничиваться применяемыми в настоящее время REP. Разрабатываемые или применяемые в настоящее время подходы регенеративной эндодонтии базируются на триаде: стволовые клетки, скаффолды (матрицы, удерживающие клетки в месте имплантации) и биоактивные молекулы [9]. Предложены различные варианты как клеточных материалов, так и материалов для скаффолдов [10]. Стволовые клетки пульпы зуба (СКПЗ) рассматриваются как одни из наиболее перспективных типов клеток для эндодонтических вмешательств. Данные клетки происходят из эктомезенхимных клеток нервного гребня [11]. Протеом и транскриптом

СКПЗ отличаются от мезенхимных стромальных клеток, несмотря на достаточно сильное сходство фенотипов [12]. С одной стороны, СКПЗ обладают характерной для мезенхимных клеток способностью дифференцироваться в трех направлениях (адипогенном, хондрогенном, остеогенном), а с другой, их остеогенная дифференцировка может проходить по уникальному типу — с формированием внеклеточного матрикса дентинового типа [13–15], что делает их очень ценным материалом для регенеративной медицины. Схожими с СКПЗ характеристиками транскриптома и протеома обладают гингивальные фибробласты (ГФ), однако при остеогенной дифференцировке синтезируемый ими матрикс обладает большим сходством с зубным цементом, чем с дентином [12, 16].

Ранее мы разработали гелеобразный скаффолд на основе фибринового геля и СКПЗ для восстановления костных дефектов нижней челюсти [17, 18]. Клетки в составе используемого фибринового геля сохраняли способность к остеогенной дифференцировке, а сам гель после полимеризации обладал гелеобразной структурой и был пригоден для воспроизведения костного дефекта с помощью заливочных форм. Кровяной сгусток, составной частью которого являются фибриновые волокна и плазма крови, часто используется в хирургической стоматологической практике, а также в регенеративной эндодонтии [19]. Учитывая свойства СКПЗ и их роль в регенерации пульпы и формировании дентина, а также пригодность фибринового геля по своим физическим свойствам для использования в эндодонтических процедурах, мы предположили возможность использования заселенного СКПЗ фибринового геля для заполнения корневых каналов после экстирпации пульпы в качестве метода регенеративной эндодонтии.

Целью исследования являлась отработка метода и оценка эффективности использования фибринового геля со СКПЗ при проведении эндодонтического лечения сформированных зубов на животной модели. В качестве модели была выбрана карликовая свинья. Как и для человека, для свиньи характерно две дентации, молочная и постоянная. Характер формирования зачатка и прорезывание также сходны с человеческими. Зубная формула для постоянных зубов: I3, C1, P4(3), M3 (верхняя челюсть) и I3, C1 P3(4), M3 (нижняя челюсть) [20]. Несмотря на то что в целом зубы свиньи по форме,

## Дополнительная таблица 1

## Supplementary table 1

Реагент	Производитель
<b>Культивирование клеток</b>	
DMEM (содержание глюкозы 1 г/л)	ThermoFisher Sci, США
Фетальная бычья сыворотка	HyClone-Cytiva, США
Трипсин	HyMedia, Индия
Раствор пенициллин-стрептомицина 100X	«Биолот», Россия
Среда для криоконсервации FreezeMeTwo	Capricorn Scientific, Германия
РеалБест ДНК <i>Mycoplasma hominis</i> / <i>Mycoplasma genitalium</i> (комплект 1)	«Вектор-Бест», Россия
Мусо Real-Time	«Евроген», Россия
Тест-система для выявления микоплазм с использованием ПЦР	Институт цитологии РАН, Россия
<b>Изготовление фибринового геля</b>	
Тромбин	ООО «Ольвекс Диагностикум», Россия
CaCl <sub>2</sub> 10%	ООО «Дальфимфарм», Россия
Кислота аминокaproновая 50 мг/мл	ПАО «Биосинтез», Россия
<b>Анестезия и наркоз, постоперационное ведение</b>	
Анестофол С (Пропофол)	ВИК, Россия
Ксилазин 2%	Alfasan, Нидерланды
Телазол (тилетамин-золазепам)	Zoetis, Испания
Метрогил Дента® (Metrogyl Denta®)	Unique Pharmaceutical Laboratories, Индия
Амоксициллин	ООО «НИТА-ФАРМ», Россия
<b>Оперативное вмешательство</b>	
Коллапан	ООО «Интермедапатит», Россия
Кетгут	ООО «Линтэкс», Россия
Mira Kagayaki паста полировочная	ООО «Кагаяки», Россия
Апекслокатор «ЭндоЭст-3Д»	ООО «Геософт», Россия
К-файлы, К-римеры, Н-файлы	Eurofiles, Россия
Минеральный триоксидный агрегат (МТА)	ООО «НКФ Омега-Дент», Россия
Упрочненный пакуемый стеклоиномерный цемент химического отверждения GC Fuji IX GP	GC Corporation, Япония
<b>Изготовление гистологических срезов</b>	
10% раствор нейтрального забуференного формалина (pH 7,4) (Histosafe)	ООО «Биовитрум», Россия
Декальцификатор TBD-2	ThermoFisher, США
Раствор для проводки IsoPREP	ООО «Биовитрум», Россия
Парафиновая среда HISTOMIX	ООО «Биовитрум», Россия
Гематоксилин-эозин	ООО «Биовитрум», Россия

соотношению коронковой и корневой части достаточно сильно отличаются от человеческих, некоторые из зубов схожи с человеческими и имеют два, три или четыре корня [20].

В ходе исследования на карликовых свиньях мы показали, что длина, форма и объем корневых каналов схожи с таковыми у человека. Это позволяет использовать при эндодонтическом лечении подходы и оборудование, разработанное для человека, что повышает релевантность модели. При первичном эндодонтическом лечении зуба и заполнении системы корневых каналов скаффолдом на основе фибринового геля и СКПЗ в апикальной части канала наблюдали формирование васкуляризированной пульпоподобной стромальной ткани, а в средней и устьевой третях корня рядом с базофильными массами выявлены участки с палисадным слоем цилиндрических клеток — активных одонтобластов, продуцирующих дентин. В периапикальной области эндодонтически леченного зуба не зарегистрировано воспалительных процессов, а также отклонений в самочувствии животных и их пищевом поведении. Полученные пилотные результаты свидетельствуют о перспективе развития методов регенеративной эндодонтии для лечения постоянных зубов со сформированными корнями. Скаффолды на основе фибринового геля в целом подходят для целей регенеративной эндодонтии, однако необходима доработка метода с целью формирования архитектоники пульпы.

### Материалы и методы

Информация об использованных расходных материалах представлена в Дополнительной таблице 1.

### Животные

Исследование было проведено на половозрелых карликовых свиньях ( $n = 2$ ) старше 2-х лет, масса животного 1 составляла 37, а второго — 41 кг. Животные клинически здоровы, свободны от сальмонеллеза, шигеллеза, эшерихиоза, кампилобактериоза, иерсиниоза, включая *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; лептоспироза, листериоза, туберкулеза, вакцинированы от рожи свиней, классической чумы свиней, болезни Ауески и обработаны от паразитов [21].

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии

от 14 ноября 2023 г. № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований», а также директивой Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Описанные исследования с участием животных были одобрены локальным этическим комитетом СЗГМУ им. И.И. Мечникова (протокол № 12 этического комитета от 11.12.2019). Проект плана исследования рассмотрен на заседании биоэтической комиссии на соответствие принципам «3Rs» и Директиве 2010/63/EU.

Все хирургические процедуры выполняли на базе АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИЙ».

### Стволовые клетки пульпы зуба

Аллогенные СКПЗ карликовой свиньи получены, как описано нами ранее в [12, 14, 17]. Клетки культивировали на адгезивном культуральном пластике (TPP, Швейцария) в среде DMEM (1 г/л глюкозы) (ThermoFisher, США), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (HyClone-Cytiva, США), а также антибиотики пенициллин и стрептомицин («Биолот», Россия). Клетки пассировали и криоконсервировали в среде FreezeMeTwo (Capricorn) согласно стандартным протоколам. На всех этапах работы с клеточными культурами соблюдали условия асептической работы, подтверждаемые регулярными результатами микробиологического контроля. Перед использованием для приготовления геля среду, в которой культивировали клетки, собирали и использовали для проверки отсутствия бактериальной и грибковой контаминации (ОФС 1.2.4.3 Стерильность), а также контаминации микоплазмами (*Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. fermentans*, *M. mycoides*, *M. genitalium*, *M. gallisepticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *M. synoviae*, *M. salivarium*, *Ureaplasma* sp, *Acholeplasma laidlawii*). Верификацию отсутствия микоплазм проводили методом ПЦР по конечной точке и ПЦР в режиме реального времени с помощью следующих наборов: РеалБест ДНК *Mycoplasma hominis* / *Mycoplasma genitalium* (комплект 1) («Вектор-Бест», Россия), Myco Real-Time («Евроген», Россия), и тест-системы для выявления микоплазм с использованием ПЦР (Институт цитологии РАН, Россия, заявка на изобретение № 2024134334). Для изготовле-

ния клеточнозаселенного фибринового геля использовали клетки на 4-м пассаже.

### Фибриновый гель

Компоненты фибринового клея (полимеризующий раствор и выделенный из криопреципитата фибриноген с СКПЗ) изготавливали как описано в [17, 22]. Для приготовления аутологичных криопреципитатов (1 мл) использовали кровь (9 мл) животных, участвующих в эксперименте. Далее транспортировали к месту проведения операции, не смешивая, полимеризующий раствор, содержащий тромбин, CaCl<sub>2</sub> и криопреципитат, содержащий клетки (3 млн СКПЗ / 250 мкл криопреципитата). Смешивание компонентов, полимеризующего раствора и фибриногена (1:1), осуществляли непосредственно перед введением геля (3 мкл, 15 000–18 000 клеток) в корневые каналы.

### Анестезия и наркоз

С целью иммобилизации карликовых свиней во время рентгенологического исследования им медленно внутривенно вводили пропофол в дозе 8 мг/кг (рис. 1А) [23].

Для предоставления достаточной анальгезии при выполнении хирургического вмешательства использовали анестезиологический протокол, включающий в себя комбинацию ксилазина в дозе 2 мг/кг и тилетамин-золазепам 5 мг/кг [24]. Местная анестезия — лидокаин 20 мг/мл.

### Оперативное вмешательство

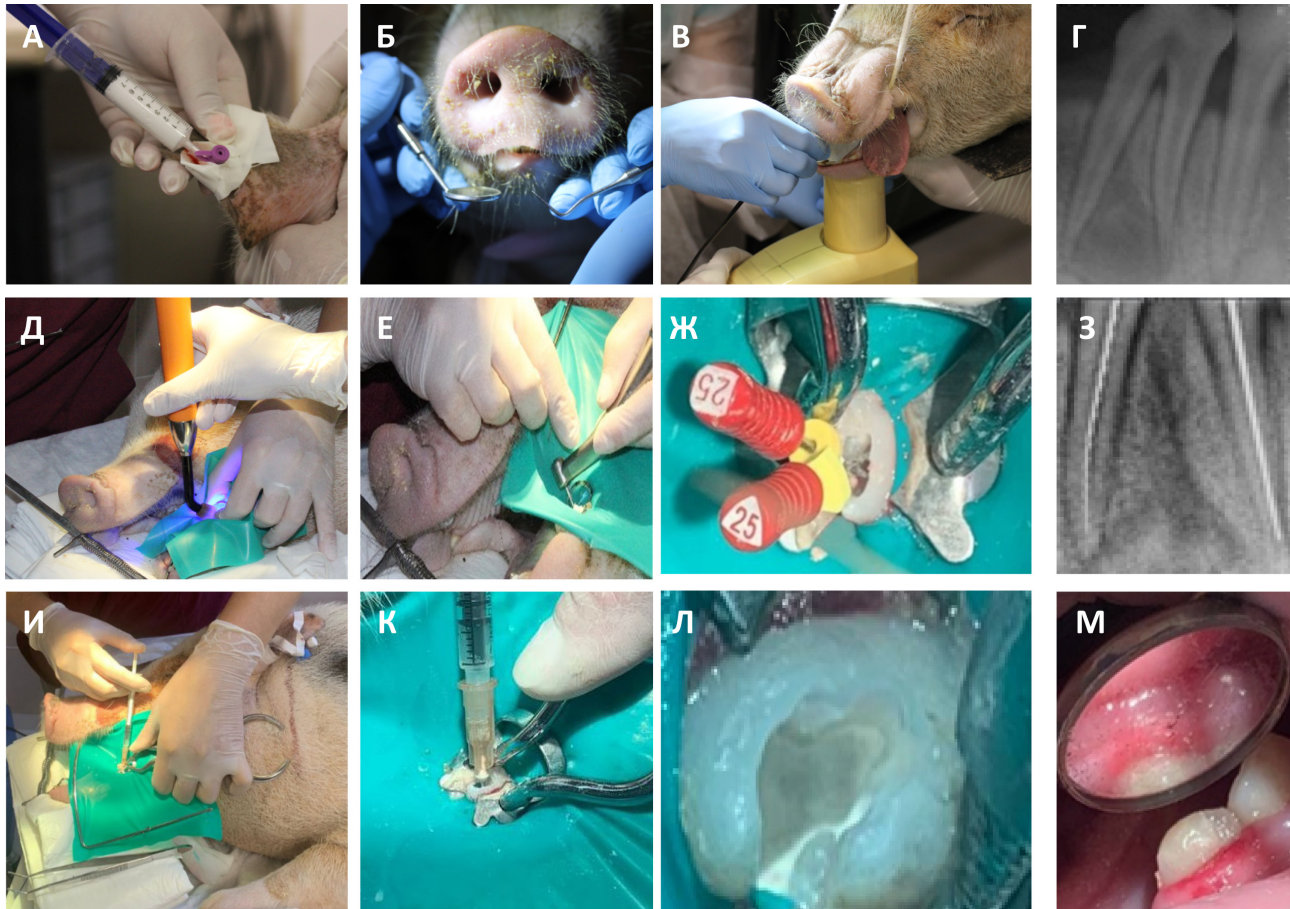
Ход операции проиллюстрирован на рисунке 1.

После осмотра полости рта и рентгенологического обследования (рис. 1Б, В) в области нижней челюсти для работы был выбран первый левый жевательный интактный двухкорневой зуб (Р2) (рис. 1Г). Под наркозом был установлен роторасширитель, антисептическая обработка проведена 0,05% водным раствором хлоргексидина биглюконата. Выполнена инфильтрационная анестезия 1% раствором лидокаина в объеме 2 мл, зуб очищен от минерализованных зубных отложений ручным серповидным скейлером, отполирован пастой «Мира» («Кагаяки», Россия) с использованием циркулярной щетки и изолирован системой коффердам (рис. 1Д).

Под охлаждением физиологическим раствором выполнена трепанация коронки и полости зуба

P2 с помощью алмазного шаровидного бора (рис. 1Е). Стерильными инструментами проведена ампутация коронковой части и экстирпация корневой пульпы. Определение рабочей

длины выполняли с помощью апекслокатора «ЭндоЭст-3Д» («Геософт», Россия) К-файлом 08. Проведена механическая обработка ручными файлами (рис. 1Ж) под ирригацией 2% водным



**Рис. 1.** Ход оперативного вмешательства – регенеративное эндодонтическое лечение с использованием СКПЗ в фибриновом геле: А – введение пропофола в ушную вену животного для наркотизации перед проведением рентгенологических исследований; Б – осмотр с помощью зеркала и зонда; В – внутриворотная контактная рентгенография для выбора зуба, оптимального по форме и размеру каналов; Г – на рентгеновском снимке показан первый левый интактный премоляр (P2) нижней челюсти, выбранный по результатам рентгенологического обследования животного; Д – использование в работе изоляции латексным платком, полимеризационной лампой происходит отсвечивание дополнительной изоляции жидким коффердамом; Е – начало работы, вскрытие пульпарной камеры; Ж – один из этапов эндодонтической обработки – видно, что в медиальный канал помещен К-ример (геометрическая маркировка – треугольник) 25.02, а в дистальный канал – К-файл (геометрическая метка – квадрат) 25.02; З – контрольный рентгенологический снимок рабочей длины каналов; И, К – введение СКПЗ в составе фибринового геля в корневые каналы; Л – вид на полость зуба с установленным материалом (МТА, Минеральный триоксид агрегат); М – вид пломбы из стеклоиономерного цемента химического отверждения GC Fuji IX GP с вестибулярной стороны

**Fig. 1.** Surgical procedure – regenerative endodontic treatment using DPSC in fibrin gel: А – Intravenous administration of propofol via the auricular vein for anesthesia prior to radiographic examination. Б – Clinical examination using a dental mirror and probe. В – Intraoral periapical radiography for the selection of a tooth with optimal canal morphology. Г – The radiographic image shows the selected first left intact mandibular premolar (P2), chosen based on the animal's radiographic examination. Д – Placement of a latex rubber dam for isolation; a curing light is used to polymerize the additional isolation with a liquid rubber dam. Е – Initiation of the procedure: access cavity preparation and pulp chamber exposure. Ж – An image representing one of the stages of root canal instrumentation: a K-reamer (geometric marking: triangle) 25/02 is placed in the mesial canal, and a K-file (geometric marking: square) 25/02 is placed in the distal canal. З – Working length determination radiograph. И, К – Injection of DPSC within a fibrin gel scaffold into the root canals. Л – The pulp chamber after placement of the capping material (MTA, Mineral Trioxide Aggregate). М – View of the final restoration using GC Fuji IX GP chemically cured glass ionomer cement from the vestibular (buccal) side

раствором хлоргексидина биглюконата. В ходе обработки были использованы последовательно: К-файлы 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, К-римеры 10, 15, 20, 25, Н-файлы 25, 30, 35, 40. Подобная обработка позволяет удалить полностью содержимое корневого канала, обработать его стенки, состоящие из дентина, создать апикальный упор (мастер-файл 40.02) и придать каналу форму усеченного конуса. После каждого инструмента осуществлялась ирригация корневого канала раствором антисептика. На завершающем этапе промывали физиологическим раствором. На расстоянии 0,5 мм от анатомического апекса создан апикальный упор под рентгенологическим контролем длины (рис. 13): дистальный канал = 21 мм, медиальный канал = 20,5 мм. Высушивание проводили стерильными бумажными адсорбентами. Согласно существующим протоколам эндодонтического лечения высушивание осуществляется стерильными бумажными адсорбентами, маркированными по ISO и имеющими такую же конусность, как и файлы. Использование адсорбентов позволяет убедиться в отсутствии дезинфицирующего раствора, экссудата, кровоточивости, остаточных тканей пульпы. Данная методика является стандартной при эндодонтическом лечении корневых каналов у людей и включена в клинические рекомендации «Пульпит у взрослых пациентов» (редакция от 20.12.2024). В результате сохраняется физиологическое отверстие в апексе корня, ниже которого образуется фиброз, а выше располагается пломбировочный материал.

Равномерное заполнение корневых каналов фибриновым гелем со стволовыми клетками до устьев каналов выполняли с помощью инсулинового шприца (рис. 1И, К). Далее проведена изоляция скаффолда минеральным триоксидным агрегатом (МТА, «ОмегаДент» Россия) толщиной 2 мм (рис. 1Л) и выполнена пломбировка коронковой части упрочненным пакуемым стеклоиономерным цементом химического отверждения GC Fuji IX GP, удаление излишков материала и финишная обработка пломбы (рис. 1М).

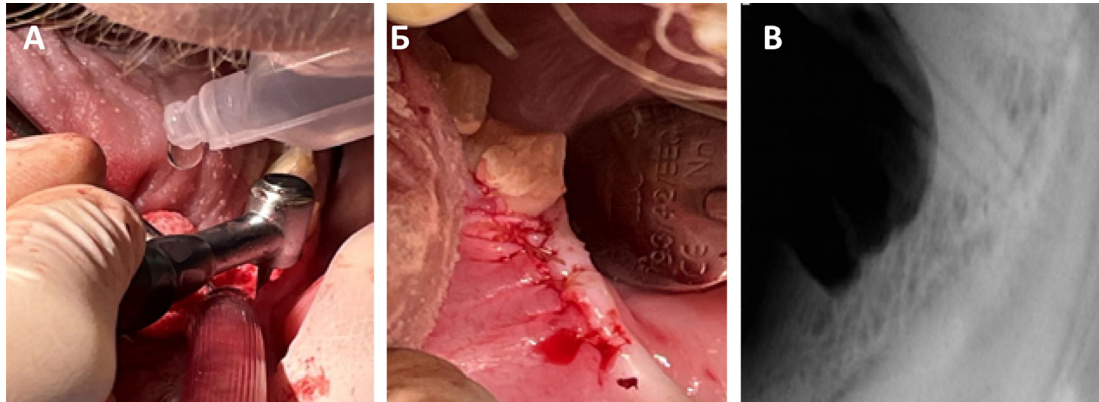
Послеоперационное ведение животных осуществлялось по следующей схеме. В течение первых трех суток после операции был исключен грубый корм, ротовую полость после каждого приема пищи промывали 0,01% бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммоний хлоридом моногидрата и наноси-

ли стоматологический гель с метронидазолом 10 мг/г и хлоргексидином 0,5 мг/г (Метрогил Дента® (Metrogyl Denta®)). На протяжении 7 дней животному вводили амоксициллин в дозе 15 мг/кг 1 раз в 48 часов трехкратно и трамадол 10 мг/кг внутримышечно. Кетопрофен 2 мг/кг предоставлялся в первые сутки после операции.

### Гистологическое исследование

Через 4 месяца после установки скаффолда с СКПЗ животное анестезировали и вводили в наркоз, как описано выше. С язычной стороны разрезом формировали слизисто-надкостничный лоскут, удаляли костную ткань для возможности удаления зуба. Далее выполняли экстракцию зуба и переносили его в фиксатор. В рану помещали гранулы препарата «Коллапан» («Интермедапатит», Россия), рана ушивалась наглухо кетгутутом («Линтекс», Россия). Выполнен контрольный рентгеновский снимок (рис. 2).

Фиксацию образцов проводили в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4). Декальцинацию проводили с использованием коммерческого декальцинирующего раствора TBD-2 (ThermoFisher, США) в течение 5 суток. Готовность образцов определяли методом пробы тонкой иглой и разрезания. На моменте возможности выполнить срезы образцы разрезали на пластинки толщиной не более 0,5 см и помещали их в гистологические кассеты для дальнейшей декальцинации до полного размягчения — 2 суток. По мере готовности материал промывали водопроводной водой и подвергали дальнейшему этапу гистологической пробоподготовки. Обезвоживание и пропитывание парафином проводили по стандартизированной методике в автоматическом гистологическом процессоре Excelsior AS (Thermo, США) в готовом растворе IsoPREP («Бiovитрум», Россия) и парафиновой среде HISTOMIX («Бiovитрум», Россия). С использованием ротационного микротомы HM 325 (Thermo, США) изготавливали ступенчатые серийные срезы толщиной 3–5 мкм, которые в дальнейшем депарафинировали, дегидратировали, окрашивали гистологическими методами по общепринятой стандартизированной методике гематоксилином-эозином («Бiovитрум», Россия) и проводили стандартное гистологическое исследование образцов. Для детализированной количественной оценки отобрали семь срезов на разных уровнях с шагом 10 мкм. препараты сканировали с использованием прибора Kfbio MagScanner KF-PRO-400 с созданием



**Рис. 2.** Удаление зуба P2 для гистологического исследования: А – работа микромоторным наконечником в момент создания язычного доступа, охлаждение физиологическим раствором; Б – рана ушита наглухо кетгутом; В – постоперационный рентгенологический контроль

**Рис. 2.** Extraction of the P2 tooth for histological examination: A – operation with a micromotor handpiece during the creation of lingual access with cooling by sterile physiological saline solution; Б – Tight suturing of the wound with catgut; В – postoperative radiographic control

архива изображений. Для морфометрии использовали автоматизированное программное обеспечение K-Viewer. Абсолютные значения длин и площадей измеряли в мкм и мкм<sup>2</sup>, степень васкуляризации выражали в %.

#### Статистическая обработка данных

Для статистической обработки использовали данные количественной оценки 7 гистологических срезов, каждый срез сканировали целиком и разбивали на 15 полей, в которых и производили подсчет оцениваемых параметров (табл. 1). Для расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, а также для оценки нормальности распределения данных количественного обсчета с помощью критерия Шапиро – Уилка использовали программное обеспечение GraphPad Prism 9.0.

#### Результаты исследования

##### Отработка метода эндодонтического хирургического вмешательства

Показано, что форма, длина каналов (дистальный канал = 21 мм, медиальный канал = 20,5 мм, рис. 1Ж, 3) первого левого жевательного двухкорневого зуба (P2 по [20]) и их форма (рис. 1Г, 3) сопоставимы с таковыми у человека. Объем каналов (3 мм<sup>3</sup>) также сходен. Поэтому подготовка каналов к установке клеточнозаселенного имплантата выполнялась по протоколам эндодонтического лечения, разработанным для человека. Таким образом, карликовая свинья, весом 37–40 кг, является удобным объектом для отработки методик регенеративной эндодонтии.

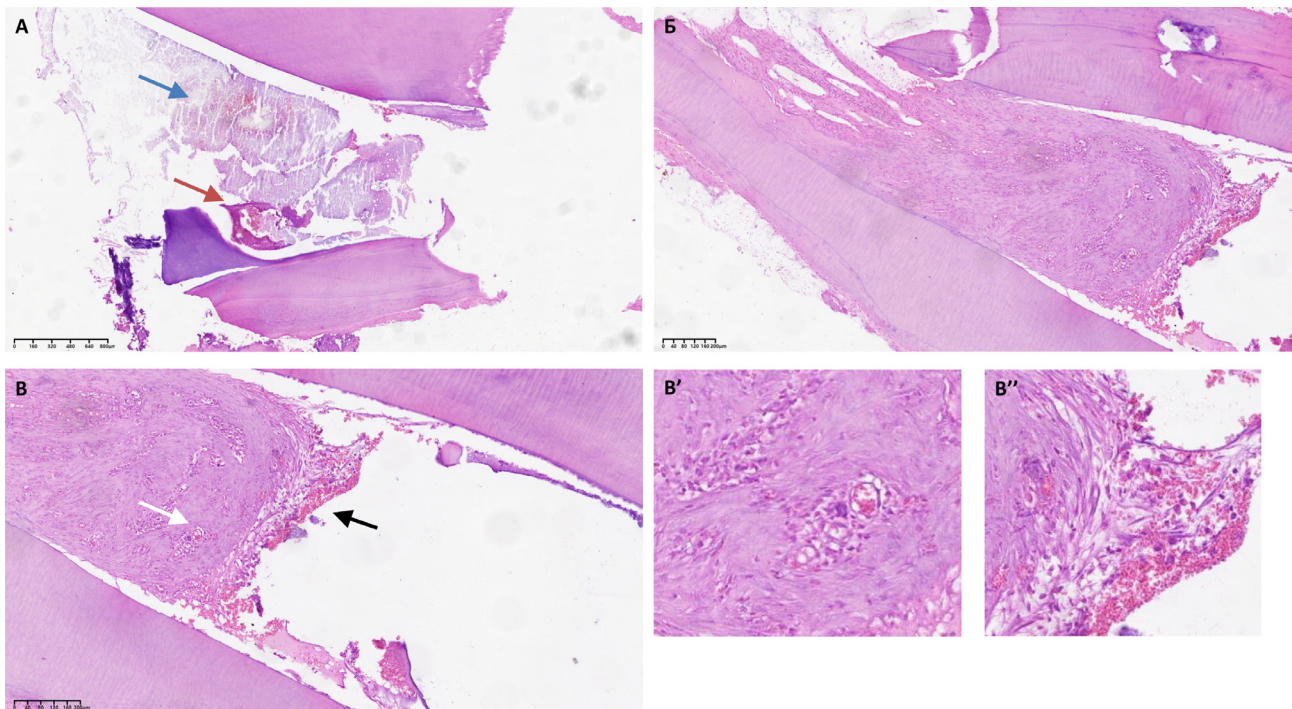
При разработке новых REP с использованием клеточных технологий существуют риски инфицирования каналов, что представляет угрозу, учитывая сравнительно мало сообщаемое с окружающей средой пространство канала и отсутствие возможности стерилизации клеточных продуктов и/или подтверждения стерильности препарата до его использования. Разрабатываемый нами клеточный продукт изготавливался в асептических условиях. Признаков воспаления, связанного с бактериальной или грибковой контаминацией каналов и прилегающих к зубу тканях, выявлено не было (рис. 2).

Перед удалением зуба был проведен анализ строения челюсти и расположения корней зубов в альвеолярных лунках. Использовали материал животных, не участвовавших в данном эксперименте и подвергнутых эвтаназии по различным причинам. При отработке методики удаления зуба на тканях *post mortem* выяснено, что ввиду особенностей расположения корней в альвеолярных лунках нижней челюсти оптимальным является удаление зуба с формированием язычного доступа. В этом случае наносится меньшее повреждение животному, т.к. удаляется меньший объем костной ткани челюсти. Поэтому у экспериментальных животных зуб со скаффолдом удаляли путем формирования язычного доступа. Животные хорошо перенесли процедуру удаления.

Таким образом, с технической стороны предлагаемая методика REP может быть использована

**Таблица 1.** Результаты морфометрии канала зуба P2 через 4 мес. после эндодонтического лечения**Table 1.** P2 Premolar Morphometry 4 Months After Endodontic Treatment

Морфометрический параметр	Значение
Площадь ткани в нижней полости, рядом с апикальным сосочком, мкм <sup>2</sup>	990 749,1
Площадь пульпоподобной ткани, мкм <sup>2</sup>	124 177,4
% пульпоподобной ткани от новообразованной ткани	12,6
Площадь сосудов в новообразованной ткани, мкм <sup>2</sup>	180 316,3
% васкуляризации новообразованной ткани	18,2
Общая длина стенок канала зуба, мкм	7667,4
Общая длина стенок канала зуба с активными одонтобластами, мкм	3227,9
% стенок канала зуба с активными одонтобластами	42,1



**Рис. 3.** Канал корня зуба P2 через 4 месяца после применения методики регенеративной эндодонтии с применением СКПЗ в фибриновом геле. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение указано на микрофотографиях: А – полость зуба, синей стрелкой отмечены базофильные массы, красной – участок пульпоподобной ткани в составе базофильных масс, также представленный на рисунке 4. Ув.  $\times 40$ ; Б – плотная пульпоподобная ткань в апикальной части корня. Ув.  $\times 100$ ; В – демаркационная зона и рыхлая пульпоподобная ткань (черная стрелка) в апикальной трети корня, белая стрелка – пример васкуляризации плотной пульпоподобной ткани. Ув.  $\times 100$ ; В' – область плотной пульпоподобной ткани с сосудом, ув.  $\times 300$ , В'' – участок демаркационной линии с рыхлой пульпоподобной тканью и скоплениями эритроцитов, ув.  $\times 300$

**Fig. 3.** Root canal of the P2 tooth 4 months after regenerative endodontic procedure using DPSC in a fibrin gel. Staining: hematoxylin and eosin. A – root canal; basophilic masses are indicated by a blue arrow; a region of pulp-like tissue within the basophilic masses (also shown in Figure 4) is indicated by a red arrow. Mag.  $\times 40$ ; B – dense pulp-like tissue in the apical part of the root. Mag.  $\times 100$ ; B – demarcation zone and loose pulp-like tissue (black arrow) in the apical third of the root; the white arrow indicates an example of vascularization within the dense pulp-like tissue. Mag.  $\times 100$ ; B' – area of dense pulp-like tissue with a blood vessel. Mag.  $\times 300$ ; B'' – section of the demarcation line with loose pulp-like tissue and accumulations of erythrocytes. Mag.  $\times 300$ . Scale bar is shown in the images

в дальнейших экспериментах для отработки протоколов эндодонтического лечения с применением клеточных технологий. Данная процедура хорошо переносится животными, является релевантной с точки зрения последующей трансляции, удобна для исследователя.

#### Результаты гистологического исследования

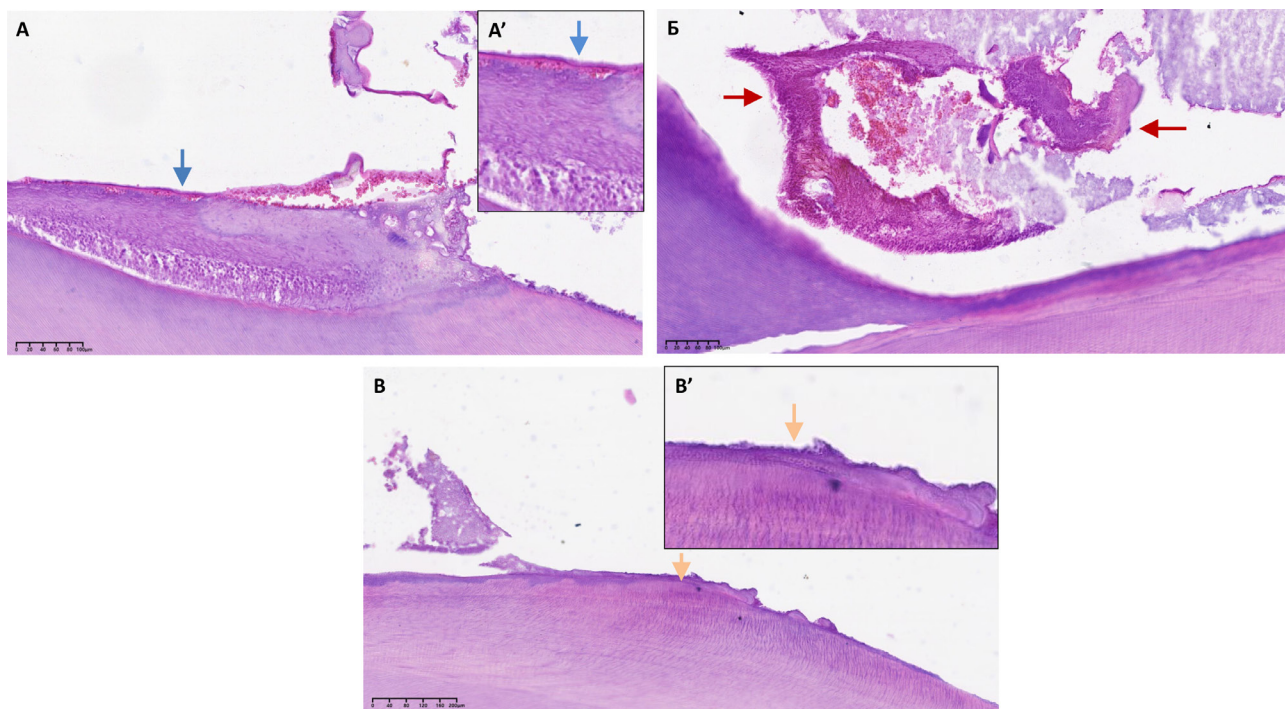
В полости корня зуба обнаружены аморфные гомогенные массы базофильного цвета, окаймленные эритроцитами (рис. 3А), что свидетельствует о частичной сохранности ткани скаффолда через 4 месяца после его установки. Сразу под «пробкой» из этих масс была выявлена полость, в которой располагалась пульпоподобная ткань (рис. 3Б, В).

Демаркационная зона масс и пульпоподобной ткани была инфильтрирована единичными клетками воспалительного ряда и эритроцитами (рис. 3В).

В зоне анатомической верхушки и физиологического сужения апекса и в апикальной трети корня была обнаружена клеточная ткань, пред-

ставленная разрастаниями клеток фибробластоподобного вида среди волокнистого матрикса, с включениями рыхлой соединительной ткани и полнокровных сосудов микроциркуляторного русла. Ближе к центральной части корня рядом с демаркационной зоной определялись фрагменты пульпоподобной ткани более рыхлого вида, также с активной васкуляризацией (рис. 3Б, В, В', В''). Площадь выявленной в апикальной трети корня ткани составила 990 749,1 мкм<sup>2</sup>, 12,6% от общей площади занимала пульпоподобная ткань (табл. 1). Степень васкуляризации новообразованной ткани составила 18,2% (табл. 1).

Локально в коронковой трети корня в полости рядом с базофильными массами выявлены участки стенки канала с палисадным слоем цилиндрических клеток, которые морфологически соответствовали активным одонтобластам, продуцирующим дентин (рис. 4А, А'). Доля стенок канала зуба с активными одонтобластами составила 42,1% от общей длины стенок на проанализированных серийных срезах (табл. 1).



**Рис. 4.** Средняя и устьевая часть канала. Окраска гематоксилином и эозином: А — участок с одонтобластами (синие стрелки). Ув.  $\times 200$ , А' — ув.  $\times 400$ ; Б — участок с пульпоподобной тканью (красные стрелки) в полости корня зуба. Ув.  $\times 200$ ; В — дентин разной плотности (оранжевые стрелки). Ув.  $\times 200$ , В' — ув.  $\times 400$

**Fig. 4.** Middle and coronal parts of the canal. Staining: hematoxylin and eosin. А — area with odontoblasts (blue arrows). Mag.  $\times 200$ ; А' — Mag.  $\times 400$ ; Б — area with pulp-like tissue (red arrows) in the tooth canal. Mag.  $\times 200$ ; В — dentin of varying density (orange arrows). Mag.  $\times 200$ ; В' — Mag.  $\times 400$

Также в полости корня зуба в толще аморфных масс выявлен фрагмент пульпоподобной ткани с большим скоплением фибробластоподобных клеток цилиндрической формы, располагающихся палисадно, и скоплений эритроцитов (рис. 3А, 4Б). На границе полости корня зуба и дентина визуализируется несколько слоев дентина разной плотности и цветности при окрашивании гематоксилином-эозином. Более базофильный слой на поверхности — новообразованный одонтобластами прединтин (рис. 4В, В').

Таким образом, результаты гистологического исследования подтверждают наличие регенеративных процессов и формирование пульпоподобной ткани в области локализации скаффолда, однако признаков формирования архитектоники пульпы не выявлено.

### Обсуждение

Регенеративная эндодонтия в ее современном состоянии — комплекс основанных на биологических методах REP. Протоколы REP (преимущественно реваскуляризация, ревитализация) направлены на восстановление функций пульпы, поддержание целостности корня зуба, регенерацию пульпы при несформированных апексах — вершинах корней [2, 6, 7, 25]. Наибольшее распространение методы REP получили в детской стоматологии при лечении травмированных зубов, что обусловлено наличием широких коротких каналов при несформированных апексах и отсутствием инфицированности пульпы. В таких зубах в редких случаях описана регенерация пульпы, но чаще исходом REP-терапии является завершение формирования корня, например за счет формирования в верхушке корня цементаобразных структур или врастания костной ткани [8, 26]. Такая парадигма существенно снижает область применения. Кроме этого, при существующих технологиях REP речь идет скорее о репарационных, а не регенеративных процессах — в ходе терапии формируется замещающая ткань, а не истинный пульпо-дентинный комплекс. Принято говорить применительно к REP не о регенерации, а о «созревании» (maturation) корня [7, 8]. Поэтому разработка методов регенеративной эндодонтии, позволяющих достичь формирования истинного пульпо-дентинного комплекса и соответствующей архитектоники пульпы, остается одним из наиболее ожидаемых событий в стоматологии.

В настоящее время становится ясно, что для достижения такой цели необходимо использование

новых подходов, основанных на применении клеточных технологий, в которых применение клеточного материала дополняется использованием скаффолдов и биологически активных молекул, направляющих и контролирующих развитие пульпы [7, 9, 26]. Кроме этого, методы REP нуждаются в адаптации для лечения совершеннолетних пациентов, у которых восстановительный потенциал пульпы уже снижен, корни сформированы, а причиной повреждений пульпы чаще являются не травмы, а инфекции.

В нашем исследовании мы использовали в качестве модели взрослых животных с полностью сформированными корнями постоянных зубов. Частично мы сохранили концепцию кровяного сгустка, используя фибриновый гель, представляющий собой фибриновый сгусток, приготовленный на основе криопреципитата плазмы крови. Согласно полученным нами данным использование фибринового геля допустимо при выполнении эндодонтических вмешательств — в ходе вмешательства и в течение 4-месячного периода наблюдения побочных эффектов не наблюдалось. Следует отметить, что в проведенных экспериментах не выявлено каких-либо побочных эффектов, связанных с применением клеточного материала, — в области установки скаффолда не выявлено следов воспалительных процессов, новообразований, животные вели нормальный образ жизни и сохраняли репродуктивную активность, онкологических заболеваний в течение последующего года не выявлено. Таким образом, предлагаемая технология представляется безопасной, тем не менее необходимы дальнейшие исследования, соответствующие существующим регуляторным нормам [27]. Дополнительным достоинством предлагаемого метода является отсутствие необходимости создания кровяного сгустка — используемые для этого подходы повышают риск инфицирования тканей.

При проведении таких исследований выбор животной модели очень важен. Часто используемые в исследованиях грызуны не являются релевантной моделью из-за размера и другого механизма роста зубов. Так, у кроликов нет настоящей закрытой верхушки и корня, а сохраняющаяся активная папилла обеспечивает рост зуба в течение всей жизни [28]. Наиболее релевантными с точки зрения анатомии зуба и возможности экспериментального моделирования пульпитов, помимо дорогих и малодоступных

приматов, считаются собаки и карликовые свиньи [29]. Согласно данным нашего исследования длина каналов зуба P2 сопоставима с человеческой (рис. 1Г, Ж, З), а объем каналов этого зуба составляет около 3 мм<sup>3</sup>, что сопоставимо с данными, полученными ранее для человека [30]. Характеристики СКПЗ, стволовых клеток периодонта и папиллы карликовой свиньи сходны с человеческими [20].

Одной из проблем регенеративной эндодонтии взрослых является отсутствие достаточного количества мультипотентных клеток в составе пульпы как в результате возрастного снижения регенераторного потенциала пульпы, так и вследствие того, что наиболее распространенной причиной пульпита взрослых является инфицирование пульпы, что является показанием к ее удалению. Существуют два подхода, которые не являются взаимоисключающими: использование филлера для каналов, заселенного стволовыми клетками пульпы зуба [31–33], и использование методов витальной терапии инфицированной пульпы (ВТП) [2]. ВТП, подразумевающая не полное, а частичное удаление пульпы, только инфицированной ее части, изначально была разработана для терапии обратимых пульпитов несформированных зубов, однако сейчас предпринимаются попытки распространить ее на зубы взрослых пациентов. Для усиления регуляторного потенциала остаточной пульпы целесообразным считается введение в каналы клеток, способных к дифференцировке и формированию тех или иных компонентов пульпы.

СКПЗ — мультипотентные стромальные клетки с фенотипом, схожим с мезенхимным, однако происходящие из нервного гребня и обладающие вследствие этого большей пластичностью по сравнению с мезенхимными стромальными клетками [16, 34]. Характерной их особенностью является способность к остеогенной дифференцировке по одонтобластному типу [14, 16, 35], поэтому их использование при разработке новых методов регенеративной эндодонтии представляется логичным и перспективным решением. В наших исследованиях показано формирование васкуляризированной пульпоподобной ткани, однако не обнаружено прорастания нервных окончаний. Тем не менее на месте установки имплантата в канале в апикальной трети выявлены живые клетки, формирующие пульпоподобную ткань, а в устьевой (место перехода

пульпарной камеры в каналы корней) — выявлены одонтобласты и предентин через 4 месяца после выполнения процедуры.

Существующие методики механической обработки и протоколы ирригации (см. «Материалы и методы») подразумевают полное удаление пульпарной ткани из просвета каналов до физиологического сужения в апексе корня. Таким образом, наблюдаемые регенеративные процессы обусловлены донорским материалом. Необходимо более длительное наблюдение, а также подбор компонентов в составе геля — увеличение клеточного разнообразия и включение в состав геля реагентов, влияющих на процессы клеточной дифференцировки. Следует учитывать, что на успешность применения процедуры повлияло и отсутствие кариеса и инфекции в каналах, что облегчило формирование пульпоподобной ткани.

Необходима оценка эффективности технологии в условиях экспериментального пульпита и последующего эндодонтического лечения. Наличие инфекции существенным образом влияет на ход регенеративных процессов. СКПЗ обладают иммунорегуляторной (чаще всего иммуносупрессивной) активностью, которая, по мнению некоторых ученых, даже превышает таковую мезенхимных стромальных клеток [36]. Стоит отметить, что описаны случаи использования СКПЗ из инфицированной аутологичной пульпы, показан терапевтический эффект таких клеток, усиление их одонтогенных свойств [37, 38]. Таким образом, при наличии инфицированной пульпы СКПЗ при использовании их при эндодонтическом лечении могут не только являться источником стволовых клеток и клеток-предшественников, но и участвовать в нормализации иммунного ответа и препятствовать рецидиву воспаления после лечения, направленного на удаление источника инфекции.

### Ограничения исследования

В проведенном исследовании основной задачей являлась разработка экспериментального протокола эндодонтического лечения у карликовых свиней. Малый объем выборки и отсутствие групп сравнения являются ограничениями данного пилотного исследования и связаны с необходимостью минимизации ухудшения качества жизни использованных животных и сохранения их для племенного разведения.

В планируемых исследованиях будет увеличена выборка, что позволит ввести группы сравнения и повысить статистическую достоверность результатов. Однако следует отметить, что эндодонтическое лечение было произведено в соответствии с клиническими рекомендациями «Пульпит у взрослых пациентов» (п. 2.3. Витальная экстирпация пульпы). В соответствии с этими рекомендациями проведено расширение каналов (см. раздел «Материалы и методы»). Данная процедура используется в эндодонтии для удаления всех возможных остаточных элементов дентина и одонтобластов, а также микроорганизмов для исключения возможности рецидива — в ходе ее удаляется ткань внутреннего просвета канала и частично закрываются микроканальцы корневого канала. Поэтому полученный результат — частичная регенерация пульпы — скорее связан с внесением донорского материала, чем

с активацией собственных регенераторных механизмов реципиента, что будет дополнительно проверено в планируемых исследованиях.

### Заключение

Разработанная нами техника регенеративного эндодонтического вмешательства, основанная на применении СКПЗ, заключенных в фибриновый гель, протестирована на крупных экспериментальных животных — карликовых свиньях. Полученные данные позволяют предположить, что данная техника безопасна при тщательном соблюдении протокола. Показано формирование пульпоподобной ткани и предентина без формирования пульпо-дентинного комплекса. Таким образом, предложенная технология является перспективной для дальнейшей разработки методики регенеративной эндодонтии полностью сформированных зубов взрослых пациентов.

## Литература

1. Huang F, Cheng L, Li J, Ren B. Nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics treatment. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:1078453.
2. Lin LM, Ricucci D, Saoud TM, Sigurdsson A, Kahler B. Vital pulp therapy of mature permanent teeth with irreversible pulpitis from the perspective of pulp biology. *Aust Endod J.* 2020;46(1):154–166.
3. Noohi P, Abdekhodaie MJ, Nekoofar MH, Gama M, Saadatmand M, Dummer PMH. Development of Antimicrobial Peptide-loaded Hydrogels as Potential Scaffolds for Pulp-dentine Complex Regeneration: A Comparative Study. *J Endod [Internet].* 2025 Feb; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239925000548>
4. Colombo JS, Jia S, D'Souza RN. Modeling Hypoxia Induced Factors to Treat Pulpal Inflammation and Drive Regeneration. *J Endod [Internet].* 2020;46(9):S19–25. DOI: 10.1016/j.joen.2020.06.039
5. Jung C, Kim S, Sun T, Cho YB, Song M. Pulp-dentin regeneration: current approaches and challenges. *J Tissue Eng.* 2019;10: 2041731418819263 (Article ID).
6. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *J Endod.* 2007;33(4):377–390.
7. Lin LM, Kahler B. A Review Of Regenerative Endodontics: Current Protocols And Future Directions Rejeneratif Endodonti Üzerine Bir Derleme: Güncel Protokoller Ve Geleceğe Yönelik Öneriler. *J Istanbul Univ Fac Dent [Internet].* 2017;51:41–51. Available from: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ez.srv.meduniwien.ac.at/pmc/articles/PMC5750827/pdf/jiufd-051-s041.pdf>
8. Hasija MK, Meena B, Wadhwa D, Kumar D. Pediatric Regenerative Endodontics. *J Int Clin Dent Res Organ.* 2021 Jan;13(1):73–76. Available from: [https://journals.lww.com/10.4103/jicdro.jicdro\\_47\\_19](https://journals.lww.com/10.4103/jicdro.jicdro_47_19)
9. Fukushima KA, Marques MM, Tedesco TK, Carvalho GL, Gonçalves F, Caballero-Flores H, et al. Screening of hydrogel-based scaffolds for dental pulp regeneration—A systematic review. *Arch Oral Biol.* 2019;98(November 2018):182–194. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2018.11.023
10. Домбровская ЮА, Енукашвили НИ, Силян АВ. Методы регенеративной биоинженерии и аддитивные технологии в стоматологии. Санкт-Петербург: Политех-Пресс; 2024. 101 с. Available from: <https://e.lanbook.com/book/413090>

11. Pispas J, Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol.* 2003;262(2): 195–205.
12. Lobov A, Kuchur P, Khizhina A, Kotova A, Ivashkin A, Kostina D, et al. Mesenchymal cells retain the specificity of embryonic origin during osteogenic differentiation. *Stem Cells.* 2023 Nov 1;6:1–11. Available from: <https://academic.oup.com/stmcls/advance-article/doi/10.1093/stmcls/sxad081/7336816>
13. Son YB, Kang YH, Lee HJ, Jang SJ, Bharti D, Lee SL, et al. Evaluation of odonto/osteogenic differentiation potential from different regions derived dental tissue stem cells and effect of 17 $\beta$ -estradiol on efficiency. *BMC Oral Health [Internet].* 2021;21(1):1–14. DOI: 10.1186/s12903-020-01366-2
14. Kotova A V., Lobov AA, Dombrovskaya JA, Sannikova VY, Ryumina NA, Klausen P, et al. Comparative analysis of dental pulp and periodontal stem cells: Differences in morphology, functionality, osteogenic differentiation and proteome. *Biomedicines.* 2021;9(11):1–26.
15. Xiao X, Xin C, Zhang Y, Yan J, Chen Z, Xu H, et al. Characterization of Odontogenic Differentiation from Human Dental Pulp Stem Cells Using TMT-Based Proteomic Analysis. *Biomed Res Int.* 2020; Dec 10: 3871496 (Article ID) .
16. Volponi AA, Gentleman E, Fatscher R, Pang YWY, Gentleman MM, Sharpe PT. Composition of mineral produced by dental mesenchymal stem cells. *J Dent Res.* 2015;94(11):1568–1574.
17. Домбровская ЮА, Енукашвили НИ, Котова АВ, Билык СС, Коваленко АН, Силян АВ. Оценка возможности создания фибриновых скаффолдов, заселенных стволовыми клетками пульпы зуба, для замещения костных дефектов челюсти. *Трансляционная Медицина.* 2020 Mar 11;7(1):59–69. Available from: <https://transmed.almazovcentre.ru/jour/article/view/540>
18. Dombrovskaya YuA, Eukashvili NI, Banashkov RE, Semenova NY, Karabak IA, Silin AV. Prospects for the use of fibrin scaffolds populated with pulp and periodontal stem cells: an experimental study. *Parodontologiya.* 2021;26(2):96–103.
19. Wu Q. Regenerative endodontic treatment using autologous blood from alveolar bone for mature permanent premolar with apical periodontitis: a case report. *Clin Oral Investig.* 2023;27(8):4869–4874. DOI: 10.1007/s00784-023-05179-9
20. Wang S, Liu Y, Fang D, Shi S. The miniature pig: A useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral Dis.* 2007;13(6):530–537.
21. Акимов ДЮ, Зиятдинова АР, Снижко ЕА, Ильинская МА, Васильев АВ. Превентивные лечебные мероприятия в доклинических исследованиях (противопаразитарная обработка). *Лабораторные животные для научных исследований (Laboratory Anim Sci).* 2020;4:43–55. Available from: [https://elibrary.ru/doi\\_resolution.asp?doi=10.29296%2F2618723X-2020-04-05](https://elibrary.ru/doi_resolution.asp?doi=10.29296%2F2618723X-2020-04-05)
22. Eukashvili NI, Aizenshtadt AA, Bagaeva V V, Supilnikova O V, Ivolgin DA, Maslennikova II, et al. Assessing the possibility to apply the fibrin glue by cord blood plasma as a scaffold for mesenchymal stem cells transplantation. *Her North-Western State Med Univ named after II Mechnikov.* 2017 Jun 15;9(2):35–43. Available from: <https://journals.eco-vector.com/vszgmu/article/view/8557>
23. Akimov DY, Makarova MN, Khan SO, Shabanov PD, Liashenko PM. Effect of propofol and combination propofol and isoflurane on vital parameters of minipigs. *Bull Vet Pharmacol.* 2024;4(29):8–22. Available from: <https://rucont.ru/efd/912451>
24. Akimov DY, Shabanov PD, Khan SO. Anesthesia in preclinical studies. *Message 2: dwarf pigs. Lab Zhivotnye dlya nauchnykh Issled (Laboratory Anim Sci).* 2023 2023; 6(2): 53–65. Available from: <https://labanimalsjournal.ru/2618723x-2023-02-05>
25. Lopes LB, Neves JA, Botelho J, Machado V, Mendes JJ. Regenerative Endodontic Procedures : An Umbrella Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(754):2–17.
26. Galler KM, Brandl FP, Kirchof S, Widbiller M, Eidt A, Buchalla W, et al. Suitability of Different Natural and Synthetic Biomaterials for Dental Pulp Tissue Engineering. *Tissue Eng — Part A.* 2018;24(3–4):234–244.
27. Крышень КЛ, Андреев СВ, Дейкин АВ, Дмитриева АА, Енукашвили НИ, Леонова ЕИ, et al. Особенности доклинических исследований высокотехнологичных лекарственных препаратов. *Консультант GLP-PLANET 2024. Мнение фармацевтической отрасли: монография.* Санкт-Петербург: НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»; 2024. 344 с.

28. Sych LS, Reade PC. Heterochrony of tooth root initiation in rabbits. *J Evol Biol.* 1990; 3(3–4):283–293.
29. Aubeux D, Renard E, Pérez F, Tessier S, Geoffroy V, Gaudin A. Review of Animal Models to Study Pulp Inflammation. *Front Dent Med.* 2021; 2, 10.3389/fdmed.2021.673552 . hal-04064206.
30. Dombrovskaya YA, Kravets ON, Nikolaeva AV, Kotov MI, Dombrovskaya VI, Grebnev GA, et al. Changes in the morphological characteristics of the endodontic system and parameters of human dental hard tissues in the North-Western region of Siberia during the X–XX centuries. *Stomatology [Internet].* 2024 Dec 20;103(6):5. Available from: <https://mediasphera.ru/issues/stomatologiya/2024/6/1003917352024061005>
31. Iohara K, Utsunomiya S, Kohara S, Nakashima M. Allogeneic transplantation of mobilized dental pulp stem cells with the mismatched dog leukocyte antigen type is safe and efficacious for total pulp regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1): 116 (Article ID).
32. Nakashima M, Iohara K, Zayed M. Pulp Regeneration: Current Approaches, Challenges, and Novel Rejuvenating Strategies for an Aging Population. *J Endod.* 2020;46(9):S135–142. DOI: 10.1016/j.joen.2020.06.028
33. Sui B, Wu D, Xiang L, Fu Y, Kou X, Shi S. Dental Pulp Stem Cells: From Discovery to Clinical Application. *J Endod.* 2020;46(9):S46–55.
34. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development.* 2016;143(13):2273–2280. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27381225>
35. Lobov A, Malashicheva A. Osteogenic differentiation: a universal cell program of heterogeneous mesenchymal cells or a similar extracellular matrix mineralizing phenotype? *Biol Commun.* 2022;67(1):32–48.
36. Min Q, Yang L, Tian H, Tang L, Xiao Z, Shen J. Immunomodulatory Mechanism and Potential Application of Dental Pulp-Derived Stem Cells in Immune-Mediated Diseases. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9): 8068 (Article ID).
37. Meza G, Urrejola D, Saint Jean N, Inostroza C, López V, Khoury M, et al. Personalized Cell Therapy for Pulpitis Using Autologous Dental Pulp Stem Cells and Leukocyte Platelet-rich Fibrin: A Case Report. *J Endod.* 2019;45(2):144–149.
38. Yu S, Liu XM, Liu Y, Tang L, Lei S, Geng C, et al. Inflammatory microenvironment of moderate pulpitis enhances the osteo-/odontogenic potential of dental pulp stem cells by autophagy. *Int Endod J.* 2024;57(10):1465–77.

### Об авторах

**Домбровская Юлия Андреевна** — к.м.н., доцент кафедры стоматологии общей практики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

SPIN-код: 5551-8789

ORCID: 0000-0001-7715-1008

**Енукашвили Натэлла Иосифовна** — к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ клеточных технологий ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; зав. лабораторией не кодирующей ДНК ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук

SPIN-код: 8161-3663

ORCID: 0000-0002-5971-7917

**Семенова Наталья Юрьевна** — к.б.н., зав. лабораторией патологии кроветворения ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

SPIN-код: 3566-4723

ORCID: 0000-0003-4069-0678

Домбровская Ю.А. и соавт.

Разработка подходов к использованию клеточнозаселенных гелеобразных скаффолдов

**Багаева Варвара Владимировна** — младший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; руководитель службы обеспечения качества Центр клеточных технологий «Покровский»

SPIN-код: 7510-6930

ORCID: 0009-0008-5104-2872

**Акимов Дмитрий Юрьевич** — главный ветеринарный врач АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

SPIN-код: 2454-1481

ORCID: 0000-0003-3141-492X

**Филиппова Наталия Александровна** — ветеринарный врач участка «Лабораторные карликовые свиньи» АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

SPIN-код: 1039-4998

ORCID: 0009-0007-6959-0810

**Румянцева Елизавета Артемовна** — лаборант ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук

SPIN-код: 3835-5803

ORCID: 0009-0000-8118-0143

**Котов Михаил Иванович** — лаборант-исследователь НИЛ клеточных технологий, ординатор кафедры стоматологии общей практики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

SPIN-код: 5483-9025

ORCID: 0009-0000-6655-6181

**Досаева Олеся Юрьевна** — ординатор кафедры стоматологии общей практики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

SPIN-код: 2105-2948

ORCID: 0009-0000-6508-9518

**Саханов Антон Анатольевич** — к.м.н., доцент кафедры стоматологии общей практики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

SPIN-код: 8595-3308

ORCID: 0000-0003-4217-6330

**Кравец Ольга Николаевна** — к.м.н., доцент кафедры стоматологии общей практики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

SPIN-код: 4278-7900

ORCID: 0009-0008-3252-0605

**Приходько Егор Михайлович** — заведующий НИЛ клеточных технологий ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; генеральный директор Центра клеточных технологий «Покровский»

**Силин Алексей Викторович** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой стоматологии общей практики ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

SPIN-код: 4956-6941

ORCID: 0000-0002-3533-5615

### Authors

**Yulia A. Dombrovskaya** — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of General Practice Dentistry North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov

SPIN-code: 5551-8789

ORCID: 0000-0001-7715-1008

**Natella I. Enukashvily** — Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of the Cell Technologies Research Laboratory North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; Head of the Non-Coding DNA Laboratory Institute of Cytology Russian Academy of Science  
SPIN-code: 8161-3663  
ORCID: 0000-0002-5971-7917

**Natalia Yu. Semenova** — Cand. Sci. (Biology), Head of the Hematopoiesis Pathology Laboratory Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency; Senior Researcher V.A. Almazov National Medical Research Center  
SPIN-code: 3566-4723  
ORCID: 0000-0003-4069-0678

**Varvara V. Bagaeva** — Junior Researcher North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; Head of Quality Assurance Service Cell Technologies Center “Pokrovsky”  
SPIN-code: 7510-6930  
ORCID: 0009-0008-5104-2872

**Dmitry Yu. Akimov** — Chief, Veterinary Officer Research and Manufacturing center “Home of Pharmacy”  
SPIN-code: 2454-1481  
ORCID: 0000-0003-3141-492X

**Natalia A. Filippova** — Veterinarian of the “Laboratory Miniature Pigs” Unit, Research and Manufacturing center “Home of Pharmacy”  
SPIN-code: 1039-4998  
ORCID: 0009-0007-6959-0810

**Elisaveta A. Rumyantseva** — Laboratory Assistant Institute of Cytology, Russian Academy of Science  
SPIN-code: 3835-5803  
ORCID: 0009-0000-8118-0143

**Mikhail I. Kotov** — General Practice Dentist, Clinical Resident North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov  
SPIN-code: 5483-9025  
ORCID: 0009-0000-6655-6181

**Olesya Yu. Dosaeva** — General Practice Dentist, Clinical Resident North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov  
SPIN-code: 2105-2948  
ORCID: 0009-0000-6508-9518

**Anton A. Sakhanov** — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of General Practice Dentistry, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov  
SPIN-code: 8595-3308  
ORCID: 0000-0003-4217-6330

**Olga N. Kravets** — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of General Practice Dentistry, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov  
SPIN-code: 4278-7900  
ORCID: 0009-0008-3252-0605

**Egor M. Prikhodko** — Head of the Cell Technologies Research Laboratory, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; Head of the Center Cell Technologies Center “Pokrovsky”  
SPIN-code: 6312-3920  
ORCID: 0000-0002-5049-1368

**Alexey V. Silin** — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of General Practice Dentistry, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov  
SPIN-code: 4956-6941  
ORCID: 0000-0002-3533-5615

Домбровская Ю.А. и соавт.

Разработка подходов к использованию клеточнозаселенных гелеобразных скаффолдов

### Вклад авторов

**Ю.А. Домбровская** — концептуализация, разработка методологии, проведение исследований, администрирование проекта, руководство исследованием, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи.

**Н.И. Енукашвили** — концептуализация, разработка методологии, проведение исследований, привлечение финансирования, администрирование проекта, руководство исследованием, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи.

**Н.Ю. Семенова** — проведение исследований, анализ данных, визуализация.

**В.В. Багаева** — проведение исследований.

**Д.Ю. Акимов** — обеспечение исследований, проведение исследований.

**Н.А. Филиппова** — проведение исследований.

**Е.А. Румянцева** — обеспечение исследований.

**М.И. Котов** — обеспечение исследований.

**О.Ю. Досаева** — обеспечение исследований.

**А.А. Саханов** — обеспечение исследований.

**О.Н. Кравец** — обеспечение исследований.

**Е.М. Приходько** — обеспечение исследований.

**А.В. Силин** — концептуализация.

Авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

### Author contribution statement

**Yulia A. Dombrovskaya** — conceptualization, methodology, investigation, project administration, supervision, writing — original draft, writing — review & editing.

**Natella I. Enuakashvily** — conceptualization, methodology, investigation, funding acquisition, project administration, supervision, writing — original draft, writing — review & editing.

**Natalia Yu. Semenova** — investigation, formal analysis, visualization.

**Varvara V. Bagaeva** — investigation.

**Dmitry Yu. Akimov** — investigation.

**Natalia A. Filippova** — investigation.

**Elisaveta A. Rumyantseva** — investigation.

**Mikhail I. Kotov** — investigation.

**Olesya Yu. Dosaeva** — investigation.

**Anton A. Sakhanov** — investigation.

**Olga N. Kravets** — investigation.

**Egor M. Prikhodko** — resources.

**Alexey V. Silin** — conceptualization.

All authors have read and approved the final manuscript for publication and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.