

УДК: 616.314
doi:

Бионические принципы в технологии роботической биопечати зубной эмали *in situ*

Малышев И.Ю.^{1,4}, Рунова Г.С.¹, Подураев Ю.В.², Буйнов М.А.², Климов Д.Д.², Хесуани Ю.Д.³, Миронов В.А.³, Парфенов В.А.³, Перейра Ф.Д.А.С.³, Буданова О.П.⁴, Бахтина Л.Ю.⁴, Янушевич О.О.¹

¹ Московский Государственный Медико-Стоматологический Университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, ул. Делегатская, д. 20/1

² Московский Государственный Технологический Университет «СТАНКИН» Министерства образования и науки России, Москва, Вадковский переулок, д. 3а, а

³ Лаборатория биотехнологических исследований «3D Bioprinting Solutions», Москва, Каширское шоссе, д. 68, стр. 2

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Потеря зубов приводит к нарушению обработки пищи, ухудшает эстетический вид и в целом здоровье и качество жизни индивида. Главными причинами заболеваний и потери зубов являются повреждение эмали и кариес. Недостатки современных методов лечения повреждений эмали породили идею о выращивании биологических эквивалентов этой ткани. При этом стало очевидным, что восстановить полноценную эмаль можно только с учетом законов естественного развития этой ткани. В обзоре рассмотрены механизмы естественного амелогенеза, а затем на основе понимания этих механизмов проанализирована возможность разработки технологии восстановления эмали с помощью роботической 3D биопечати тканей *in situ*. Эти технологии могут обеспечить серьезные преимущества, например, увеличат до пожизненного срок годности «биопломбы»; решат проблему герметичности между новой и старой эмалью и снизят риски развития вторичного кариеса и других осложнений; снизят негативные последствия «человеческого фактора», и др. Есть основания полагать, что технологии роботической 3D биопечати *in situ* позволят восстанавливать не только отдельные ткани зуба, но и целый зуб и в значительной степени заменят существующие методы протезирования зубов.

Ключевые слова: амелогенез, тканевая инженерия, биопечать, стволовые клетки, роботические технологии.

Для цитирования: Малышев И.Ю., Рунова Г.С., Подураев Ю.В., Буйнов М.А., Климов Д.Д., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А., Парфенов В.А., Перейра Ф.Д.А.С., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю., Янушевич О.О. Бионические принципы в технологии роботической биопечати зубной эмали *in situ*. Патогенез. 2017; 15(3): 33–42.

Для корреспонденции: Малышев Игорь Юрьевич, доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. E-mail: iymalyshev1@gmail.com

Финансирование. Обзор написан при поддержке Министерства здравоохранения РФ (Государственное задание Министерства здравоохранения РФ от 2 февраля 2016 года № 056-00139-16, уникальный номер реестровой записи 110 401 000 000 000 071 021 02)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Поступила 20.03.2017

Bionic principles in the technology of robotic bioprinting of tooth enamel in situ

Malyshev I.Y.¹, Runova G.S.¹, Poduraev Yu.V.², Buinov M.A.², Klimov D.D.², Khesuani Yu.D.³, Mironov V.A.³, Parfenov V.A.³, Pereira F.D.A.S.³, Budanova O.P.⁴, Bakhtina L.Y.⁴, Yanushevich O.O.¹

¹ Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Deligatskaya Str. 20/1, Moscow, Russia

² Moscow State Technological University STANKIN, Vadkovsky Pereulok 3a, Moscow, Russia

³ Biotechnology Research Laboratory, 3D Bioprinting Solutions, Kashirskoe Shosse 68, Bldg. 2, Moscow, Russia

⁴ Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Baltijskaya Str. 8, Moscow, Russia

Loss of teeth leads to disruption of food processing, worsens the aesthetic appearance and generally, the health and quality of life of the individual. The major causes of diseases and tooth loss are damage to the enamel and caries. Limitations of current methods for treatment of enamel damage gave birth to the idea of growing biological equivalents of this tissue. At the same time, it became obvious that it is possible to regenerate the enamel only taking into account the laws of natural development of this tissue. The review focuses on mechanisms of natural amelogenesis, and then based on understanding of these mechanisms, analyzes a possibility of developing a technology for regeneration of enamel by means of *in situ* robotic 3D bioprinting of tissues. Such technologies might provide some serious benefits, for example, prolong the shelf life of dental biofillings to a lifetime; solve the problem of tightness between the new and old enamel and reduce the risk of developing secondary caries and other complications, etc. There is a reason to believe that the technology of *in situ* robotic 3D bioprinting will allow to restore not only tooth tissues, but also the whole tooth and largely replace the existing methods of dental prosthetics.

Key words: amelogenesis, tissue engineering, bioprinting, stem cells, robotic technologies.

For citation: Malyshev I.Y., Runova G.S., Poduraev Yu.V., Buinov M.A., Klimov D.D., Khesuani Yu.D., Mironov V.A., Parfenov V.A., Pereira F.D.A.S., Budanova O.P., Bakhtina L.Y., Yanushevich O.O. Bionic principles in the technology of robotic bioprinting of tooth enamel *in situ*. *Pathogenesis*. 2017; 15(3): 33–42 (In Russian).

For correspondence: Malyshev Igor Yurievich, doctor of medical sciences, professor, sciences head department of pathophysiology, head of the laboratory of regulatory mechanisms of stress and adaptation. E-mail: iymalyshev1@gmail.com

Funding. The review was written with the support of the Ministry of Health of the Russian Federation (State task of the Ministry of Health of the Russian Federation of February 2, 2016 No. 056-00139-16, a unique number of the register entry 110 401 000 000 000 000 071 021 02).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 20.03.2017

Введение

Потеря зубов вследствие разных общесоматических заболеваний, заболеваний пародонта и тканей зубов, а также травм приводит к нарушению первичной обработки пищи и воспроизведения речи, ухудшает эстетический вид и в целом здоровье и качество жизни индивида. В России у людей старше 65 лет, в среднем, удалено 18 зубов, а 14% жителей являются полностью беззубыми. При этом имеется много людей, у которых нет зубов уже к 30 годам. Повреждение эмали и кариес являются главными причинами заболеваний и потери зубов. В мире от 60 до 80% детей школьного возраста и почти 100% взрослых имеют кариес, множественные трещины и повреждения эмали. Повреждение эмали может быть также обусловлено наследственными заболеваниями, такими, как несовершенный амелогенез.

Для компенсации утраченной эмали, обычно используют композитные материалы (пломбы). Однако этот подход имеет ряд возможных осложнений. Во-первых, через 4–5 лет герметичность границы между пломбой и эмалью нарушается, что увеличивает риск развития вторичного кариеса и/или выпадения пломбы. Во-вторых, при подготовке к пломбированию и удалении пораженной кариесом эмали, снимается большое количество зубной ткани, что ослабляет коронку зуба и может привести к расколу зуба. В-третьих, во время удаления глубоких кариозных тканей зуба велик риск повреждения пульпарной камеры, что требует депульпации зуба. В-четвертых, частыми осложнениями при постановке пломб являются хронический пульпит, периодонтит и локализованный пародонтит. И наконец, в-пятых, пломбирование может нарушить важный физиологический баланс между твердостью и упругостью эмали и подлежащего дентина.

Недостатки современных методов лечения кариеса и повреждений эмали, породили идею о выращивании биологических эквивалентов зубных тканей с помощью стволовых клеток. Это направление получило название «регенеративная стоматология». При этом становится все более очевидным, что восстановить полноценную зубную ткань можно только с учетом законов естественного развития этой ткани.

В данном обзоре будут рассмотрены молекулярные и клеточные механизмы естественного формирования эмали зуба, а затем на основе понимания этих механизмов проанализирована возможность разработки технологии восстановления утраченной эмали с помощью роботической биопечати тканей *in situ*.

Молекулярные и клеточные механизмы амелогенеза

Эмаль — это самая твердая ткань в организме человека. В отличие от других минерализованных тканей, она не содержит клеток и состоит главным образом из кристаллов гидроксиапатита (75%), карбонатного апатита (12%) и небольшого количества белков, воды, липидов и углеводов. Предполагается, что способность живых организмов к биоминерализации некоторых своих тканей появилась более 500 миллионов лет тому назад [1]. После этого живые организмы стали использовать биоминерализацию для производства зубной эмали. Появление эмали увеличило эффективность жевания и откусывания пищи и обеспечило эволюционное преимущество животным, потому что зубы, покрытые эмалью, позволили потреблять ранее недоступные пищевые ресурсы. Благодаря этому присутствие высших организмов на планете сильно расширилось.

Эмаль позволяет зубам выдерживать миллионы циклов нагрузок при откусывании и пережевывании пищи, а также защищает зуб от проникновения бактерий [2]. Эмаль производят высокоспециализированные клетки, амелобласты. Амелобласты секретируют белки, минерализация которых гидроксиапатитом приводит к образованию эмали [3]. Всю совокупность молекулярных и клеточных механизмов формирования эмали обозначают термином «амелогенез». Амелогенез начинается с дифференцировки клеток дентального эпителия в амелобласты.

Дифференцировка амелобластов регулируется взаимодействием мезенхимы и эпителия

Дифференцировку амелобластов инициируют реципрокные взаимодействия между дентальным эпителием и мезенхимой на стадии колпачка естественного одонтогенеза в ходе эмбрионального развития организма [4]. На этой стадии, дентальный эпителий формирует пять клеточных компартов, необходимых для формирования эмали и других тканей зуба (рис. 1). Это эмалевый орган, внутренний эмалевый эпителий, внешний эмалевый эпителий, звездчатый ретикулум между внутренним и внешним эмалевым эпителием, и прослойка клеток, которая контактирует с внешним эмалевым эпителием. Амелобласты дифференцируются из внутреннего эмалевого эпителия. Этот процесс состоит из трех стадий (рис. 1): инициаторной, пресекреторной и секреторной [4].

На стадии инициации эмалевый орган выделяет Wnt10A. Wnt10A проникает через базальную мембрану и запускает дифференцировку мезенхимальных клеток в преодонтобласты. Преодонтобласты начинают секретировать

ровать коллаген I типа, который отодвигает преодонтобласты от эпителия. Отступая преодонтобласты, оставляют отростки, из которых выделяются неколагенные белки, такие как дентин-сиалофосфопротеин. Эти белки стимулируют минерализацию коллагена и образование дентина. При этом клеточные отростки остаются в дентине, формируя его тубулярную структуру.

На пресекреторной стадии базальная мембрана между эпителием и мезенхимой деградирует [5], что позволяет преодонтобластам контактировать с клетками внутреннего эмалевого эпителия и стимулировать их дифференцировку в преамелобласты [6].

На третьей, секреторной стадии, преамелобласты окончательно дифференцируются в амелобласты. В этом процессе важную роль играют одонтобласты, Dlx3 (Distal-less homeobox 3) в преамелобластах и контакты преамелобластов с клетками прослойки. Так, было показано, что продуцируемые одонтобластами факторы роста BMP [7, 8] обеспечивают окончательное созревание преамелобластов, а фактор транскрипции Dlx3 в преамелобластах активирует экспрессию генов белков матрицы эмали, таких, как энамелин и амелогенин [9]. Контакты преамелобластов с клетками прослойки, которые образуются в области десмосом благодаря молекулам адгезии Nectin-1 на амелобластах и Nectin-3 на клетках прослойки также важны для созревания и секреторной активности амелобластов [10]. Предположение о важности этих контактов возникло после обнаружения у мышей с мутациями Nectin-1 и -3 выраженных дефектов эмали [10]. Кроме того, клетки прослойки продуцируют алкалин фосфатазу и Shh [11, 12], которые также вовлечены в созревание амелобластов. В целом, третья стадия дифференцировки амелобластов знаменуется полным созреванием этих клеток и началом продукции на

границе с дентином специфических белков, которые образуют матрицу эмали.

Процесс Томса и образование призматической эмали

Амелобласты секретируют белки амелогенины, амелобластины, энамелины, тафтелины и амелотины, которые формируют белковую матрицу эмали [13]. При нарушении синтеза этих белков эмаль становится хрупкой или не образуется совсем [14]. Другие белки, секретируемые амелобластами, например Ca^{2+} -связывающие фосфопротеины, обеспечивают прикрепление этих клеток к образующейся эмали [15].

Параллельно с формированием белковой матрицы происходит ее минерализация. В результате образуется эмаль, и амелобласты отодвигаются от границы с дентином. События, происходящие в это время на одном из концов амелобласта, а именно выделение белков матрицы, выделение ферментов-инициаторов минерализации матрицы и сам процесс минерализации матрицы был обозначен термином «процесс Томса» [16]. Процесс Томса у млекопитающих имеет две важные особенности: во-первых, секретируя белки, амелобласты движутся от границы с дентином под углом 60° [17], и во-вторых, на конце амелобласта есть два сайта секреции белков матрицы, дистальный и проксимальный, которые располагаются под углом 30° друг к другу. Поэтому каждый амелобласт по мере своего движения осуществляет два процесса Томса под углом 30° . Дистальный процесс Томса вырабатывает нановолокна кристаллов гидроксиапатита, которые образуют эмалевую призму. Проксимальный процесс Томса продуцирует нановолокна гидроксиапатита под углом к призме, образуя межпризменную эмаль (рис. 2) [16]. По мере «созревания» первичной эмали белки постепенно удаляются, освобождая место для латерального от-

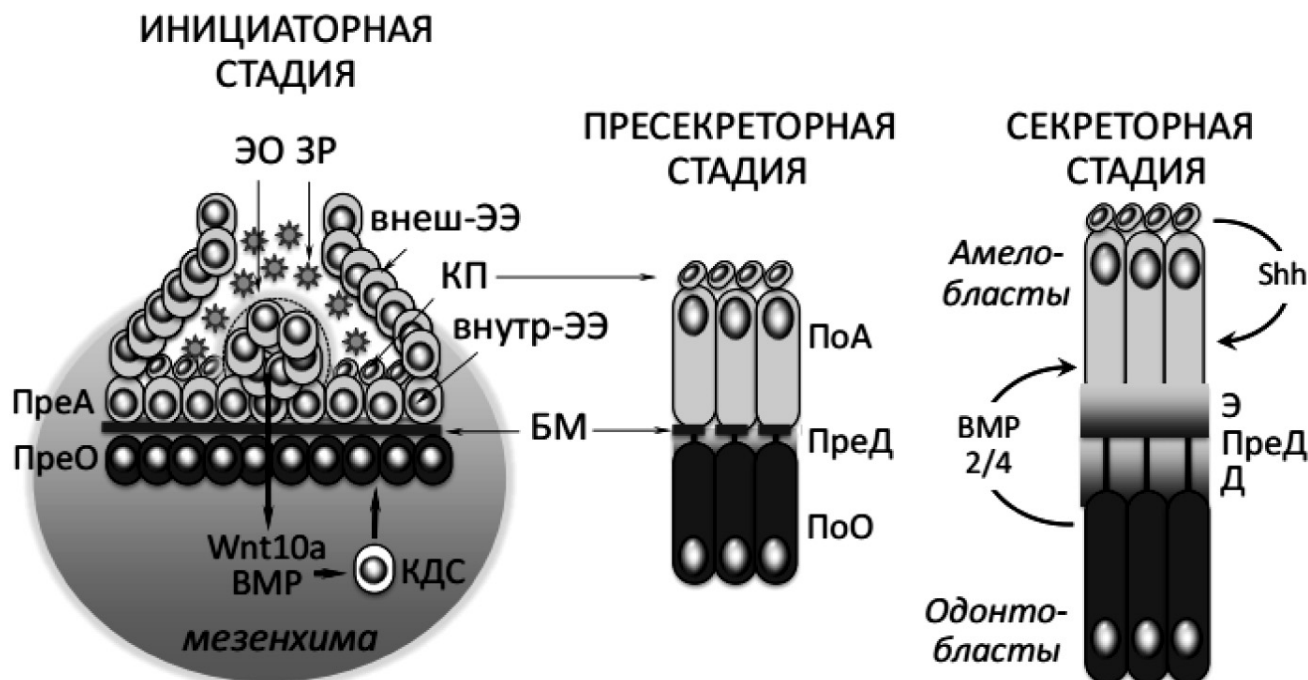


Рис. 1. Эпителиально-мезенхимальные взаимодействия, регулирующие дифференцировку одонтобластов и амелобластов. А — амелобласты, БМ — базальная мембрана, внеш-ЭЭ — внешний эмалевый эпителий, внутр-ЭЭ — внутренний эмалевый эпителий, ЗР — звездчатый ретикулум, Д — дентин, КДС — клетки дентального сосочка, КП — клетки прослойки, О — одонтобласты, ПоА — поляризованные амелобласты, ПоО — поляризованные одонтобласты, ПреА — преамелобласты, ПреД — преодонтобласты, Э — эмаль, ЭО — эмалевый орган. Модифицировано с рисунка из [4]. Описание в тексте.

ложения кристаллов гидроксиапатита. В результате в зрелой эмали каждая призма в поперечном сечении достигает 4–5 мкм в диаметре [18]. Способность амелобластов создавать разную ориентацию волокон гидроксиапатита является главной предпосылкой уникальной твердости эмали [19]. Механизмы, которые контролируют морфологию и ориентацию кристаллов гидроксиапатита, до конца не совсем понятны [20]. Имеющиеся экспериментальные данные лишь слегка приоткрыли «черный ящик».

Было показано, что в процессе синтеза белков и их минерализации волокна кристаллов гидроксиапатита остаются прикрепленными к мембране амелобластов через специфические участки амелобластина и амелогенина [21, 22]. Установлено также, что белки матрицы секретируются в форме высокомолекулярных продуктов, которые расщепляются металломатричной протеазой MMP-20 [23]. Незначительную часть продуктов расщепления сразу поглощают амелобласты, и в результате, освобождается место для формирования кристаллов. Другая часть продуктов расщепления амелогенина с молекулярной массой не больше 20 кДа приобретают способность связывать Ca^{2+} и PO_4^{3-} к остаткам глутаминовой кислоты, аспарагина и фосфосерила и формировать первичный кристаллит гидроксиапатита кальция. И, наконец, в экспериментах на нокаутных мышах, было установлено, что удаление гена амелогенина сопровождается утратой способности амелобластов формировать призмы эмали, а образующаяся при этом апризматическая эмаль имеет толщину в два раза меньшую по сравнению с нормальной эмалью [24]. Таким образом, амелогенин имеет критическое значение для формирования призм эмали.

Градиент твердости эмали и механизмы его создания

Основная функция эмали состоит в том, чтобы обеспечить твердую поверхность зуба для эффективного откусывания и разжевывания пищи. Твердость эмали максимальна, при 100% содержании апатита. Однако чистый апатит имеет твердость в 6 раз выше, чем у дентина [25].

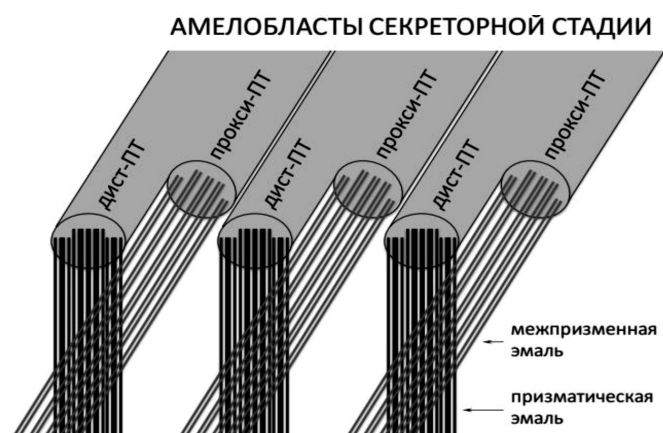


Рис. 2. Схематическое изображение конфигурации и морфологии амелобластов при образовании разных типов эмали на секреторной стадии амелогенеза.

Белки, которые образуют волокна гидроксиапатита в призме, секретируются с дистального сайта амелобластов дистальным процессом Томса (дист-ПТ), а белки, которые образуют волокна гидроксиапатита в межпризменной эмали, секретируются с проксимального сайта амелобластов проксимальным процессом Томса (прокси-ПТ). Модифицировано с рисунка из [28].

Поэтому любая деформация зуба с эмалью из чистого апатита во время жевания вызовет повреждение подлежащего дентина. Природа предложила изящное решение этой проблемы — создание градиента твердости эмали [26]. Выяснилось, что в зубах твердость эмали уменьшается от окклюзионной поверхности по направлению к дентину от 6 ГПа, что соответствует твердости чистого апатита, до 2,5–3,0 ГПа на границе с дентином [27, 28, 29] (рис. 3). Твердость эмали определяется соотношением минеральных и белковых компонентов. Действительно, самый твердый поверхностный слой человеческой эмали толщиной до 20 мкм, состоит практически из чистого гидроксиапатита [16]. Формирование градиента твердости эмали происходит следующим образом.

Кристаллы апатита, которые формируются в начале секреторной стадии дифференцировки амелобластов, имеют в поперечном сечении всего 2–3 нм. По мере движения амелобластов от границы с дентином, волокна апатита растут в длину и к концу секреторной стадии их поперечное сечение увеличивается до 10 нм [16]. Такая первичная эмаль содержит много белка и уступает по твердости эмали взрослого зуба. Дальше происходит вторичная минерализация эмали. Она связана с высвобождением протеазы, калликреина-4 (KLK-4) [30]. KLK-4 расщепляет белки матрицы, а амелобласты поглощают продукты расщепления. В результате содержание белка снижается почти в 100 раз, что делает возможным латеральный рост волокон апатита до 50 нм. Поскольку KLK-4 продуцируются амелобластами у поверхности эмали и затем диффундируют в толщу эмали, возникает градиент протеазной активности по направлению к дентину (рис. 3). Градиент протеазной активности формирует градиент белка [27, 31] и, соответственно, градиент свободного места для откладывания гидроксиапатита. Так появляется градиент твердости эмали. Биологическая целесообразность градиента твердости эмали очевидна — способствовать улучшению интеграции двух разных по твердости тканей, эмали и дентина. На поверхности зуба, где происходит откусывание и пережевывание пищи нужна твердая эмаль, а на границе с более мягким дентином, менее твердая, которая помогала бы дентину амортизировать нагрузки и не травмировала бы сам дентин.

Окончательная третичная минерализация эмали происходит после прорезывания зуба и появления коронки в полости рта. В это время амелобласты удаляются с помощью апоптоза. Основную часть неорганических веществ для продолжения минерализации эмали на этом этапе поставляет слюна [32].

Обоснование технологии восстановления эмали с помощью роботической биопечати тканей *in situ*

Колоссальная значимость кариозных и некариозных повреждений эмали в развитии серьезных заболеваний зубов [33, 34] породила большой спрос на развитие новых эффективных технологий восстановления эмали. Методы выращивания биологических аналогов ткани могли бы создать принципиально новые возможности для восстановления эмали. Однако эмаль человека формируется в течение нескольких десятков месяцев. Соответственно для технологий, которые воспроизводят естественное развитие ткани, также может потребоваться много месяцев, чтобы вырастить эмаль. Такие сроки делают

проблематичным использование методов выращивания эмали в качестве альтернативы использованию искусственных пломб.

Один из способов решения проблемы «фактора времени» мог бы состоять в том, чтобы «отпечатать» биологический эквивалент эмали с помощью 3D биопринтера, и затем перенести его на место повреждения. Однако, при трансплантации биоинженерного конструкта, возникнет проблема интеграции старой эмали с новой биоинженерной эмалью. Решить эту проблему можно было бы с помощью биопечати эмали непосредственно в место утраты этой ткани в зубе, т.е. *in situ*. В этом случае «зубное» микроокружение и амелобласты могли бы обеспечить «распечатываемую» эмаль, нужными факторами и адгезивными молекулами, которые помогут интеграции старой и новой ткани.

Однако существующие биопринтеры имеют размеры, многократно превышающие размеры ротовой полости, что приводит к невозможности «распечатать» эмаль на поврежденный зуб в челюсти пациента. Поэтому мы предложили к разработке принципиально новую для стоматологии технологию — технологию роботической 3D биопечати эмали *in situ*. Эта технология основана на принципе воспроизведения механизмов естественного амелогенеза с помощью 3D биопечати. Использование принципов трансляции фундаментальных знаний о биологических законах развития, организации, свойствах, функций и структурах живой природы в технологические разработки является предметом отдельной науки — бионики (Бионика, от др.-греч. βιον — живущее). Соответственно такие принципы называются бионическими.

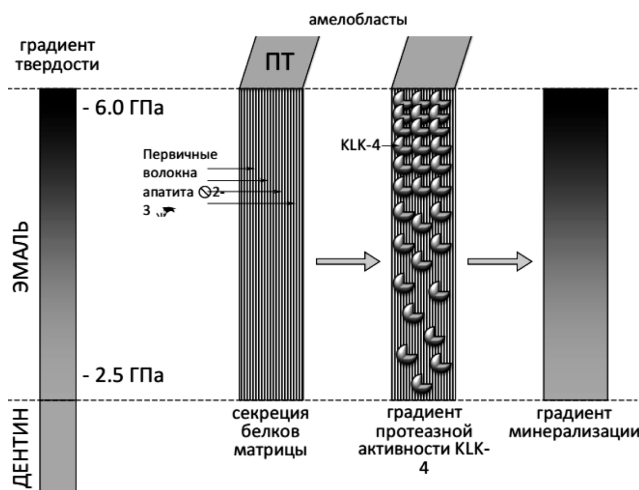


Рис. 3. Формирование градиента твердости эмали. ПТ — процесс Томса, KLK-4 — протеаза калликреин-4. Модифицировано с рисунка из [28].

В предлагаемой нами технологии роботическая рука может внести в ротовую полость маленькую печатающую головку с форсунками для клеток и материалов и обеспечит точное расположение головки над зубом. После этого биопечатающая головка произведет прецизионную биопечать в зону дефекта эмали. Такая постановка задачи является уникальной в мире, а ее решение может обеспечить России лидирующие позиции в области высокотехнологичной медицины.

Многое из того, что нужно сделать для разработки технологии роботической биопечати тканей зуба *in situ*, уже

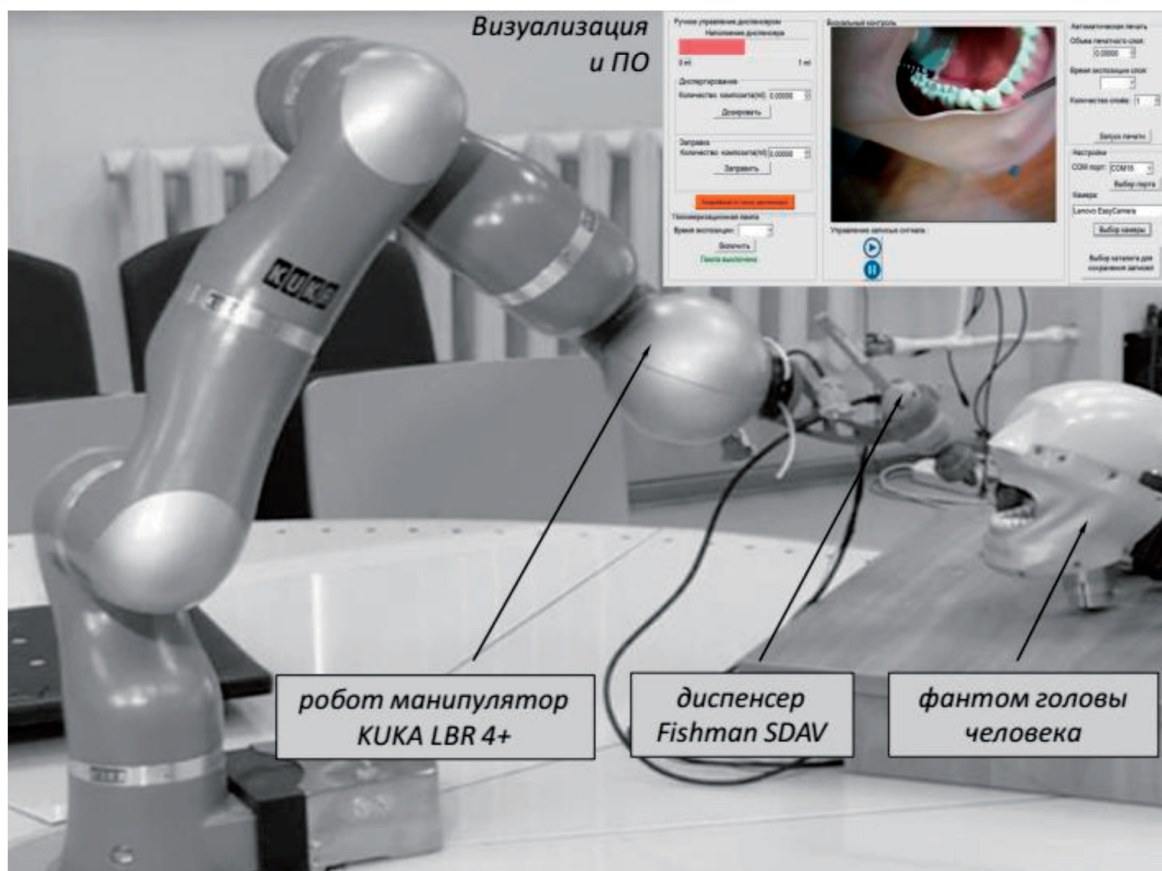


Рис. 4. Макет установки роботической биопечати эмали *in situ*. ПО — программное обеспечение.

понятно сейчас. В 2015 году французские разработчики запатентовали технологию нанесения гидроксиапатита, клеток MG63 и мезенхимальных стволовых клеток на дефект костей черепа мыши *in vivo*. Мы рассматривали эту технологию как прототип для разработки нашей технологии. На рис. 4 представлен сконструированный нами макет установки роботической биопечати эмали *in situ*, аппаратное обеспечение которого состоит из робота манипулятора KUKA LBR 4+, рабочего органа, в состав которого входят: диспенсер Fishman SDAV, используемый в первом отечественном биопринтере Фабион, эндоскопическая камера для визуализации операционного поля, и светодиоды, необходимые для полимеризации композитного пломбировочного материала, а также пульта управления оператора. Макет позволяет наносить точное количество пломбировочного материала в область дефекта эмали зуба, который находится в челюсти фантома головы человека. На основе этого прототипа, который «запечатывает» дефект эмали композитным материалом, может быть разработана технология роботической биопечати *in situ*, которая позволит «отпечатать» полный биологический аналог эмали.

На рис. 5 представлены основные составляющие такой технологии:

1. Блок подготовки поврежденного участка зуба;
2. Блок подготовки клеток и материалов для биопринтера;
3. Блок биопечати;
4. Блок роботического позиционирования биопечатающей головки.

Каждый блок имеет свои пока нерешенные проблемы.

*Подготовка поврежденного участка зуба к роботической биопечати эмали *in situ**

Подготовка поврежденного участка эмали должна начинаться с надежной фиксации челюсти, в которой находится поврежденный зуб, и состоять из нескольких этапов:

1. Выявление дефекта эмали с помощью маркеров, которые обозначают площадь и глубину дефекта;
2. Сканирование поврежденной и отмеченной маркерами области и создание цифровой модели дефекта эмали;

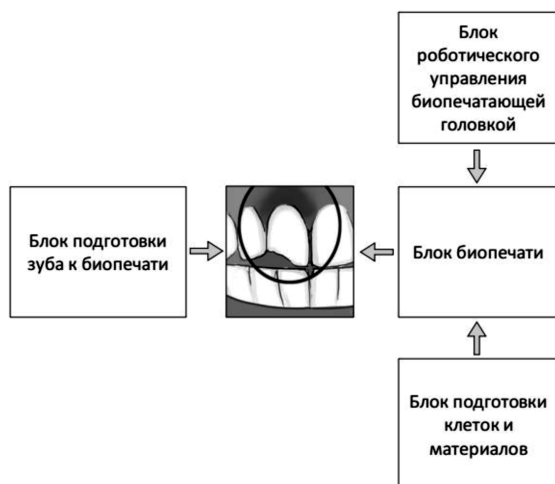


Рис. 5. Блок-схема технологии роботической биопечати эмали *in situ*.

3. Удаление, при необходимости, части эмали, пораженной кариесом, и обработка образовавшейся полости вручную врачом-стоматологом, или с помощью робота со специальным рабочим органом, в соответствии с цифровой моделью дефекта эмали;

4. Сканирование и создание цифровой 3D модели дефекта эмали для использования в последующей биопечати новой эмали *in situ*.

Принципы и важные особенности подготовки клеток для использования в технологии роботической биопечати эмали

Понимание механизмов естественного амелогенеза дает важные указания на то какие клетки и на какой стадии дифференцировки надо использовать для биопечати эмали. Учитывая важную роль одонтобластов в дифференцировке амелобластов и образовании эмали, как это ни парадоксально, становится очевидным, что проще «печатать» сразу две ткани дентин и эмаль, чем только одну эмаль. Соответственно заболевания, такие как несовершенство амелогенеза, кариозные и эрозивные повреждения эмали, достигающие дентина, будут наиболее подходящими объектами для восстановления эмали с помощью биопечати *in situ*. Это означает, что для биопечати эмали нужно готовить два пула клеток: мезенхимальные стволовые клетки, которые можно дифференцировать до одонтобластов и дентальные эпителиальные клетки, которые можно использовать для создания аналога первичного эмалевого узла и дифференцировать в амелобласты.

Аргументом за использование одонтобластов при биофабрикации эмали также являются данные о том, что одонтобласты продуцируют белки, которые участвуют в формировании матрицы эмали, например, ММП-20 и тафтелин-интерактивный белок [35].

*Модификация методов биопечати для использования в технологии роботической биопечати эмали *in situ**

Устройство биопечати должно иметь:

1) несколько диспенсеров для нанесения разных типов клеток, ростовых факторов и других биоматериалов на область дефекта эмали;

2) систему позиционирования биопечатающей головки;

3) устройство управления распределением клеток и биоматериала в соответствии с цифровой моделью дефекта эмали.

Задача биофабрикации эмали с помощью 3D биопечати состоит в том, чтобы максимально воссоздать условия естественного амелогенеза для производства эмали. Понимание механизмов амелогенеза позволяет предложить варианты решения этой задачи:

1. Прежде всего, необходимо решить, какую стадию амелогенеза целесообразно воспроизводить: начальную или более позднюю. При воспроизведении начальной стадии, головка биопринтера должна на дне дефекта эмали, проникающего до дентина, распечатать слой мезенхимальных стволовых клеток, затем базальную мембрану, над мембраной два слоя эпителиальных клеток, имитирующих внутренний эмалевый эпителий и клетки прослойки и сверху сфероид эпителиальных клеток, имитирующий эмалевый узел (рис. 6). При воспроизведении более поздней стадии, надо распечатать сначала слой одонтоб-

ластов, а над ним поместить слой амелобластов, без базальной мембраны и сверху пласт эпителиальных клеток, имитирующих клетки прослойки (рис. 6). Плюсом первого подхода является относительная простота, потому что не нужно предварительно дифференцировать клетки *in vitro*, а недостатком — большой срок формирования эмали и риск развития опухоли при использовании стволовых клеток. Второй подход, более предпочтителен, потому что может быстрее сформировать эмаль без риска опухолевого роста.

2. При биопечати *in situ* важно обеспечить выживание клеток. Для выживания клеток необходимы питательные вещества и кислород. Питательные вещества могут содержаться в биочернилах, а кислород, вероятно, может поступать со стороны дентина.

3. Важной задачей биопечати является обеспечение быстрого, приемлемого для клиники, образования эмали. Добавление ростовых факторов, вероятно, поможет решить эту задачу. Среди таких факторов заслуживают внимание выделяемые эпителием WNT10a и Shh, выделяемые одонтоблантами BMP и Dlx3 преамелобластов (см. выше).

4. Следующая задача биопечати состоит в том, чтобы обеспечить прикрепление образующейся новой эмали к старой эмали. Известно, что амелобласты прикрепляются к эмали с помощью адгезивных белков, выделяемых этими клетками, такими, как кальций-связывающий фосфопротеин, обогащенный пролином и глутамином-1 [15]. Соответственно можно ожидать, что амелобласты, используемые в биопечати, выделяя адгезивные белки, будут способствовать прикреплению новой эмали к существующей.

5. Важная задача биопечати эмали *in situ* состоит в том, чтобы создать условия для биоминерализации синтезируемой амелоблантами белковой матрицы. В этом процессе важную роль играют белки-инициаторы, такие как алкалинфосфатаза. Эти белки выделяются амелоблантами.

Поэтому можно предположить, что при биопечати амелоблантами, эти клетки обеспечат инициирование минерализации [28]. Второй важный фактор минерализации — наличие Ca^{2+} и PO_4^{3-} . При естественном амелогенезе до прорезывания зуба эти ионы поступают из амелобластов, а после прорезывания — из слюны. Поэтому будет целесообразно добавлять в биочернила ионы Ca^{2+} и PO_4^{3-} .

6. И, наконец, еще одна из видимых сегодня проблем — воспроизведение градиента твердости распечатываемой эмали. Можно надеяться, что при правильной процедуре амелобласты сами создадут нужный градиент. Кроме того, учитывая, что окклюзионный слой эмали состоит практически из чистого гидроксиапатита, завершить биопечать можно печатью тонкого слоя безбелкового апатита с «пропечатыванием» бороздочек и бугорков зуба. При этом необходимо понять, как до формирования полноценной эмали защитить напечатанный клеточно-биоматериальный конструкт эмали от повреждений при жевании. Возможно, эту проблему можно будет решить с помощью постановки временной коронки.

*Модификация и адаптация роботических устройств и программного обеспечения для использования в технологии роботической биопечати тканей *in situ**

Разработка технологии роботической биопечати эмали потребует создания нового вида роботических систем для решения таких задач, как 3D сканирование зубной полости, компьютерная обработка полученной модели с целью определения дефектов зубной ткани, например наличие кариозных зон, трещин и истончение эмали и др., построение 3D графической модели зубной полости и дефекта эмали, задание врачом алгоритма биопечати через дружественный интерфейс «врач-робот», автоматическая генерация и выполнение программы движения роботом и мехатронным рабочим органом, осуществляющим биопечать, проектирование прецизионных аппаратно-программных устройств для нанесения клеток и материала в соответ-

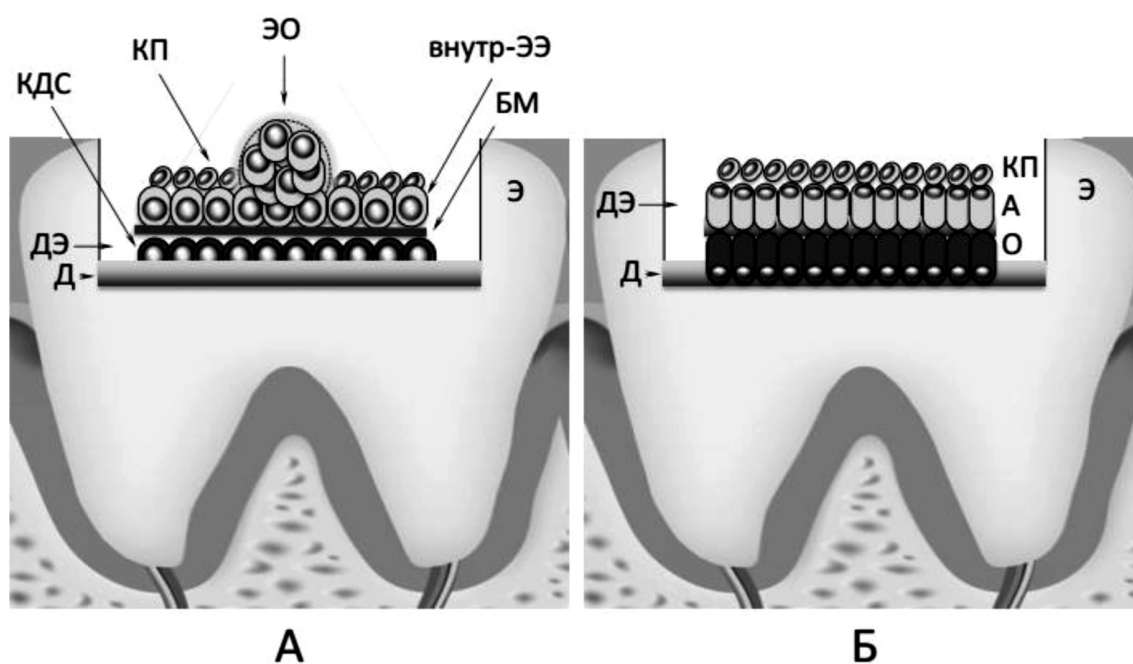


Рис. 6. Две тактики роботической биопечати эмали *in situ*: воспроизведение ранней (А) и поздней стадии (Б) амелогенеза. А — амелобласты, БМ — базальная мембрана, внутр-ЭЭ — внутренний эмалевый эпителий, Д — дентин, ДЭ — дефект эмали, КДС — клетки дентального сосочка, КП — клетки прослойки, О — одонтобласты, Э — эмаль, ЭО — эмалевый орган.

тствии с цифровой моделью дефекта эмали и автоматизированный контроль качества результатов биопечати. Роботическая система также должна обеспечить безопасность пациента благодаря введению 3D-визуализации операционной зоны и применению силовой системы оцувствления работа.

Заключение

Технологии роботической 3D биопечати эмали *in situ* могут обеспечить несколько серьезных преимуществ по сравнению с существующими методами лечения, а именно:

- 1) решат проблему герметичности границ между новой и старой эмалью и практически полностью снизят вероятность развития вторичного кариеса;
- 2) увеличат до пожизненного срок годности «биопломбы»;
- 3) благодаря минимальному удалению зубной ткани при устранении кариозного участка снизят вероятность раскола зуба и проникновения в пульпарную камеру;
- 4) снизят вероятность развития осложнений, которые могут возникать после пломбирования зубов искусственными материалами;
- 5) восстановят важный физиологический баланс между твердостью и упругостью эмали и подлежащего дентина, который трудно сохранить при использовании композитных материалов;
- 6) снизят негативные последствия «человеческого фактора» и др.

Не вызывает сомнения, что в следующем десятилетии регенеративная стоматология станет неотъемлемым компонентом лечения многих трудноизлечимых заболеваний зубов. Есть основания также полагать, что технологии роботической 3D биопечати *in situ* позволят восстанавливать не только отдельные ткани зуба, но и весь зубной комплекс и в значительной степени заменят существующие методы протезирования зубов. Важно и то, что разработанные в технологии роботической 3D биопечати зубных тканей *in situ* подходы, могут помочь развитию технологий регенерации других тканей и органов и окажут влияние на всю регенеративную медицину.

Список литературы

1. Mann S. Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry. Oxford Univ. Press. 2001; 3: 24-37. <https://doi.org/10.1002/ange.200390090>
2. Lyaru D.M., Medina J.F., Sarvide S., Bervoets T.J., Everts V., Denbesten P., Smith C.E., Bronckers A.L. Barrier formation: potential molecular mechanism of enamel fluorosis. *Journal of Dental Research*. 2014; 93(1): 96-102. <https://doi.org/10.1177/0022034513510944>
3. Habelitz S. Materials engineering by ameloblasts. *Journal of Dental Research*. 2015; 94(6): 759-67. <https://doi.org/10.1177/0022034515577963>
4. Balic A., Thesleff I. Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Current Topics in Developmental Biology*. 2015; 115: 157-86. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.006>
5. Khaddam M., Huet E., Vallee B., Bensidhoum M., Le Denmat D., Filatova A. et al. EMMPRIN/CD147 deficiency disturbs ameloblast-odontoblast cross-talk and delays enamel mineralization. *Bone*. 2014; 66: 256-66. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.019>
6. Slavkin H.C., Bringas P. Epithelial-mesenchyme interactions during odontogenesis. IV. Morphological evidence for direct heterotypic cell-cell contacts. *Developmental Biology*. 1976; 50(2): 428-42. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90163-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90163-9)
7. Wang X.P., Suomalainen M., Jorgez C., Matzuk M.M., Werner S., Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast

differentiation. *Developmental Cell*. 2004; 7(5): 719-30. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.012>

8. Feng J., Yang G., Yuan G., Gluhak-Heinrich J., Yang W., Wang L. Abnormalities in the enamel in *bmp2*-deficient mice. *Cells, Tissues, Organs*. 2011; 194(2-4): 216-21. <https://doi.org/10.1159/000324644>

9. Zhang Z., Tian H., Lv P., Wang W., Jia Z., Wang S. et al. Transcriptional factor DLX3 promotes the gene expression of enamel matrix proteins during amelogenesis. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0121288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121288>

10. Yoshida T., Miyoshi J., Takai Y., Thesleff I. Cooperation of nectin-1 and nectin-3 is required for normal ameloblast function and crown shape development in mouse teeth. *Developmental Dynamics*. 2010; 239(10): 2558-69. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22395>

11. Koyama E., Wu C., Shimo T., Iwamoto M., Ohmori T., Kurisu K. et al. Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis. *Developmental Dynamics*. 2001; 222(2): 178-91. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1186>

12. Gritli-Linde A., Bei M., Maas R., Zhang X.M., Linde A., McMahon A.P. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development*. 2002; 129(23): 5323-37. <https://doi.org/10.1242/dev.00100>

13. Bartlett J.D., Simmer J.P. New Perspectives on Amelotin and Amelogenesis. *Journal of Dental Research*. 2015; 94(5): 642-4. <https://doi.org/10.1177/0022034515572442>

14. Gibson C.W., Yuan Z.A., Hall B., Longenecker G., Chen E., Thyagarajan T., Sreenath T., Wright J.T., Decker S., Piddington R. et al. Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(34): 31871-5. <https://doi.org/10.1074/jbc.m104624200>

15. Moffatt P., Wazen R.M., Dos Santos Neves J., Nanci A. Characterisation of secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich I: a novel basal lamina component expressed at cell-tooth interfaces. *Cell and Tissue Research*. 2014; 358(3):43-55. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1989-3>

16. Nanci A., Ten Cate A.R. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 8th ed. St. Louis, MO: Elsevier.; Habelitz S. Materials engineering by ameloblasts. *Journal of Dental Research*. 2015; 94(6): 759-67. <https://doi.org/10.1177/0022034515577963>

17. Sander P.M. Prismless enamel in amniotes: terminology, function and evolution. In: Teaford M.F., Smith M.M., Ferguson M.W.J. editors. *Development, function and evolution of teeth*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. 92-106 p. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511542626.007>

18. Meckel A.H., Griebstein W.J., Neal R.J. Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. *Archives of Oral Biology*. 1965; 10(5): 775-83. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(65\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0003-9969(65)90131-7)

19. Chang C.C., Hsu I.K., Aykol M., Hung W.H., Chen C.C., Cronin S.B. A new lower limit for the ultimate breaking strain of carbon nanotubes. *ACS Nano*. 2010; 4(9): 5095-100. <https://doi.org/10.1021/nn100946q>

20. White S.N., Luo W., Paine M.L., Fong H., Sarikaya M., Snead M.L. Biological organization of hydroxyapatite crystallites into a fibrous continuum toughens and controls anisotropy in human enamel. *Journal of Dental Research*. 2001; 80(1): 321-6. <https://doi.org/10.1177/00220345010800010501>

21. Ravindranath R.M., Tam W.Y., Nguyen P., Fincham A.G. The enamel protein amelogenin binds to the N-acetyl-D-glucosamine-mimicking peptide motif of cytokeratins. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(50): 39654-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.m006471200>

22. Fukumoto S., Kiba T., Hall B., Iehara N., Nakamura T., Longenecker G., Krebsbach P.H., Nanci A., Kulkarni A.B., Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *The Journal of Cell Biology*. 2004; 167(5): 973-83. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409077>

23. Bartlett J.D., Ganss B., Goldberg M., Moradian-Oldak J., Paine M.L., Snead M.L., Wen X., White S.N., Zhou Y.L. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Current Topics in Developmental Biology*. 2006; 74: 57-115. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(06\)74003-0](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(06)74003-0)

24. Espirito Santo A.R., Bartlett J.D., Gibson C.W., Li Y., Kulkarni A.B., Line S.R. Amelogenin- and enamelysin (Mmp-20)-deficient mice display altered birefringence in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix. *Connective Tissue Research*. 2007; 48(1): 39-45. <https://doi.org/10.1080/03008200601059175>

25. Katz J.L., Ukraincik K. On the anisotropic elastic properties of hydroxyapatite. *Journal of Biomechanics*. 1971; 4(3): 221-7. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(71\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0021-9290(71)90007-8)

26. Lawn B.R., Deng Y., Lloyd I.K., Janal M.N., Rekow E.D., Thompson V.P. Materials design of ceramic-based layer structures for crowns. *Journal of Dental Research*. 2002; 81(6): 433-8. <https://doi.org/10.1177/154405910208100615>

27. He L.H., Swain M.V. Enamel — a functionally graded natural coating. *Journal of Dentistry*. 2009; 37(8): 596-603. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.03.019>

28. Habelitz S. Materials engineering by ameloblasts. *Journal of Dental Research*. 2015; 94(6): 759-67. <https://doi.org/10.1177/0022034515577963>

29. Cuy J.L., Mann A.B., Livi K.J., Teaford M.F., Weihs T.P. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology*. 2002; 47(4): 281-91. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(02\)00006-7](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(02)00006-7)

30. Simmer J.P., Papagerakis P., Smith C.E., Fisher D.C., Rountrey A.N., Zheng L., Hu J.C. Regulation of dental enamel shape and hardness. *Journal of Dental Research*. 2010; 89(10): 1024-38. <https://doi.org/10.1177/0022034510375829>

31. Sa Y., Liang S., Ma X., Lu S., Wang Z., Jiang T. et al. Compositional, structural and mechanical comparisons of normal enamel and hypomaturation enamel. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10(12): 5169-77. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.023>

32. Леонтьев В.К. Эмаль как биокристаллическая система. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2016. 72 с.

33. Hayashi O., Chiba T., Shimoda Sh., Momoi Y. Demineralization and Remineralization Phenomena of Human Enamel in Acid Erosion Model. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2016; 25(1): 27- 34. <https://doi.org/10.2485/jhtb.25.27>

34. Терапевтическая стоматология: национальное руководство. Под ред. Л.А. Дмитриевой. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. 912 с.

35. Thesleff I., Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Int. Rev. Cytol.* 2002; 217: 93-135. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(02\)17013-6](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(02)17013-6)

References

1. Mann S. *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford Univ. Press. 2001; 3: 24-37. <https://doi.org/10.1002/ange.200390090>

2. Lyuruu D.M., Medina J.F., Sarvide S., Bervoets T.J., Everts V., Denbesten P., Smith C.E., Bronckers A.L. Barrier formation: potential molecular mechanism of enamel fluorosis. *Journal of Dental Research*. 2014; 93(1): 96-102. <https://doi.org/10.1177/0022034513510944>

3. Habelitz S. Materials engineering by ameloblasts. *Journal of Dental Research*. 2015; 94(6): 759-67. <https://doi.org/10.1177/0022034515577963>

4. Balic A., Thesleff I. Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Current Topics in Developmental Biology*. 2015; 115: 157-86. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.006>

5. Khaddam M., Huet E., Vallee B., Bensidhoum M., Le Denmat D., Filatova A. et al. EMMPRIN/CD147 deficiency disturbs ameloblast-odontoblast cross-talk and delays enamel mineralization. *Bone*. 2014; 66: 256-66. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.019>

6. Slavkin H.C., Bringas P. Epithelial-mesenchyme interactions during odontogenesis. IV. Morphological evidence for direct heterotypic cell-cell contacts. *Developmental Biology*. 1976; 50(2): 428-42. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90163-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90163-9)

7. Wang X.P., Suomalainen M., Jorgez C., Matzuk M.M., Werner S., Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Developmental Cell*. 2004; 7(5): 719-30. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.012>

8. Feng J., Yang G., Yuan G., Gluhak-Heinrich J., Yang W., Wang L. Abnormalities in the enamel in bmp2-deficient mice. *Cells, Tissues, Organs*. 2011; 194(2-4): 216-21. <https://doi.org/10.1159/000324644>

9. Zhang Z., Tian H., Lv P., Wang W., Jia Z., Wang S. et al. Transcriptional factor DLX3 promotes the gene expression of enamel

matrix proteins during amelogenesis. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0121288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121288>

10. Yoshida T., Miyoshi J., Takai Y., Thesleff I. Cooperation of nectin-1 and nectin-3 is required for normal ameloblast function and crown shape development in mouse teeth. *Developmental Dynamics*. 2010; 239(10): 2558-69. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22395>

11. Koyama E., Wu C., Shimo T., Iwamoto M., Ohmori T., Kurisu K. et al. Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis. *Developmental Dynamics*. 2001; 222(2): 178-91. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1186>

12. Gritli-Linde A., Bei M., Maas R., Zhang X.M., Linde A., McMahon A.P. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development*. 2002; 129(23): 5323-37. <https://doi.org/10.1242/dev.00100>

13. Bartlett J.D., Simmer J.P. New Perspectives on Amelotin and Amelogenesis. *Journal of Dental Research*. 2015; 94(5): 642-4. <https://doi.org/10.1177/0022034515572442>

14. Gibson C.W., Yuan Z.A., Hall B., Longenecker G., Chen E., Thyagarajan T., Sreenath T., Wright J.T., Decker S., Piddington R. et al. Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(34): 31871-5. <https://doi.org/10.1074/jbc.m104624200>

15. Moffatt P., Wazen R.M., Dos Santos Neves J., Nanci A. Characterisation of secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1: a novel basal lamina component expressed at cell-tooth interfaces. *Cell and Tissue Research*. 2014; 358(3):43-55. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1989-3>

16. Nanci A., Ten Cate A.R. *Ten Cate's oral histology: development, structure, and function*. 8th ed. St. Louis, MO: Elsevier.; Habelitz S. *Materials engineering by ameloblasts*. *Journal of Dental Research*. 2015; 94(6): 759-67. <https://doi.org/10.1177/0022034515577963>

17. Sander P.M. Prismless enamel in amniotes: terminology, function and evolution. In: Teaford M.F., Smith M.M., Ferguson M.W.J. editors. *Development, function and evolution of teeth*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. 92-106 p. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511542626.007>

18. Meckel A.H., Griebstein W.J., Neal R.J. Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. *Archives of Oral Biology*. 1965; 10(5): 775-83. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(65\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0003-9969(65)90131-7)

19. Chang C.C., Hsu I.K., Aykol M., Hung W.H., Chen C.C., Cronin S.B. A new lower limit for the ultimate breaking strain of carbon nanotubes. *ACS Nano*. 2010; 4(9): 5095-100. <https://doi.org/10.1021/nn100946q>

20. White S.N., Luo W., Paine M.L., Fong H., Sarikaya M., Snead M.L. Biological organization of hydroxyapatite crystallites into a fibrous continuum toughens and controls anisotropy in human enamel. *Journal of Dental Research*. 2001; 80(1): 321-6. <https://doi.org/10.1177/00220345010800010501>

21. Ravindranath R.M., Tam W.Y., Nguyen P., Fincham A.G. The enamel protein amelogenin binds to the N-acetyl-D-glucosamine-mimicking peptide motif of cytokeratins. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(50): 39654-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.m006471200>

22. Fukumoto S., Kiba T., Hall B., Iehara N., Nakamura T., Longenecker G., Krebsbach P.H., Nanci A., Kulkarni A.B., Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *The Journal of Cell Biology*. 2004; 167(5): 973-83. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409077>

23. Bartlett J.D., Ganss B., Goldberg M., Moradian-Oldak J., Paine M.L., Snead M.L., Wen X., White S.N., Zhou Y.L. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Current Topics in Developmental Biology*. 2006; 74: 57-115. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(06\)74003-0](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(06)74003-0)

24. Espirito Santo A.R., Bartlett J.D., Gibson C.W., Li Y., Kulkarni A.B., Line S.R. Amelogenin- and enamelysin (Mmp-20)-deficient mice display altered birefringence in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix. *Connective Tissue Research*. 2007; 48(1): 39-45. <https://doi.org/10.1080/03008200601059175>

25. Katz J.L., Ukraincik K. On the anisotropic elastic properties of hydroxyapatite. *Journal of Biomechanics*. 1971; 4(3): 221-7. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(71\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0021-9290(71)90007-8)

26. Lawn B.R., Deng Y., Lloyd I.K., Janal M.N., Rekow E.D., Thompson V.P. Materials design of ceramic-based layer structures for

crowns. *Journal of Dental Research*. 2002; 81(6): 433-8. <https://doi.org/10.1177/154405910208100615>

27. He L.H., Swain M.V. Enamel — a functionally graded natural coating. *Journal of Dentistry*. 2009; 37(8): 596-603. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.03.019>

28. Habelitz S. Materials engineering by ameloblasts. *Journal of Dental Research*. 2015; 94(6): 759-67. <https://doi.org/10.1177/0022034515577963>

29. Cuy J.L., Mann A.B., Livi K.J., Teaford M.F., Weihs T.P. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology*. 2002; 47(4): 281-91. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(02\)00006-7](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(02)00006-7)

30. Simmer J.P., Papagerakis P., Smith C.E., Fisher D.C., Rountrey A.N., Zheng L., Hu J.C. Regulation of dental enamel shape and hardness. *Journal of Dental Research*. 2010; 89(10): 1024-38. <https://doi.org/10.1177/0022034510375829>

31. Sa Y., Liang S., Ma X., Lu S., Wang Z., Jiang T. et al. Compositional, structural and mechanical comparisons of normal enamel and hypomaturational enamel. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10(12): 5169-77. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.023>

32. Leont'ev V.K. Enamel as biocybernetics system. M.: GEOTAR-Media; 2016. 72 p. (in Russian)

33. Hayashi O., Chiba T., Shimoda Sh., Momoi Y. Demineralization and Remineralization Phenomena of Human Enamel in Acid Erosion Model. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2016; 25(1): 27- 34. <https://doi.org/10.2485/jhtb.25.27>

34. Therapeutic dentistry: national leadership. Ed. by L.A. Dmitrievoi. M.: GEOTAR-Media; 2009. 912 p. (in Russian)

35. Thesleff I., Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Int. Rev. Cytol.* 2002; 217: 93-135. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(02\)17013-6](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(02)17013-6)

Сведения об авторах

Малышев Игорь Юрьевич, доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии, зав. лабораторией регуляторных механизмов стресса и адаптации

Рунова Галина Сергеевна, канд. мед. наук, доцент

Подураев Юрий Викторович, доктор техн. наук, директор

Буйнов Максим Александрович, аспирант

Климов Даниил Дмитриевич, аспирант

Хесуани Юсэф Джорджиевич, управляющий партнер, соучредитель лаборатории биотехнологических исследований

Мионов Владимир Александрович, канд. мед. наук, научный руководитель лаборатории биотехнологических исследований

Парфенов Владислав Александрович, инженер

Перейра Фредерико Давид Де Сена, инженер

Буданова Ольга Петровна, ст. научн. сотр.

Бахтина Лидия Юрьевна, канд. биол. наук, вед. научн. сотр.

Янушевич Олег Олегович, доктор мед. наук профессор, ректор