

Человеческий дентин как современный материал для костной регенерации

Masaru Murata¹, Toshiyuki Akazawa², Masaharu Mitsugi³,
In-Woong Um⁴, Kyung-Wook Kim⁵ and Young-Kyun Kim⁶

¹Медицинский университет Хоккайдо,

²Hokkaido Organization,

³Оральный и челюстно-лицевой хирург, Такамацу

⁴Tooth Bank Co. Ltd

⁵Университет Данкук,

⁶Больница Сеульского национального университета в

Бунданге,

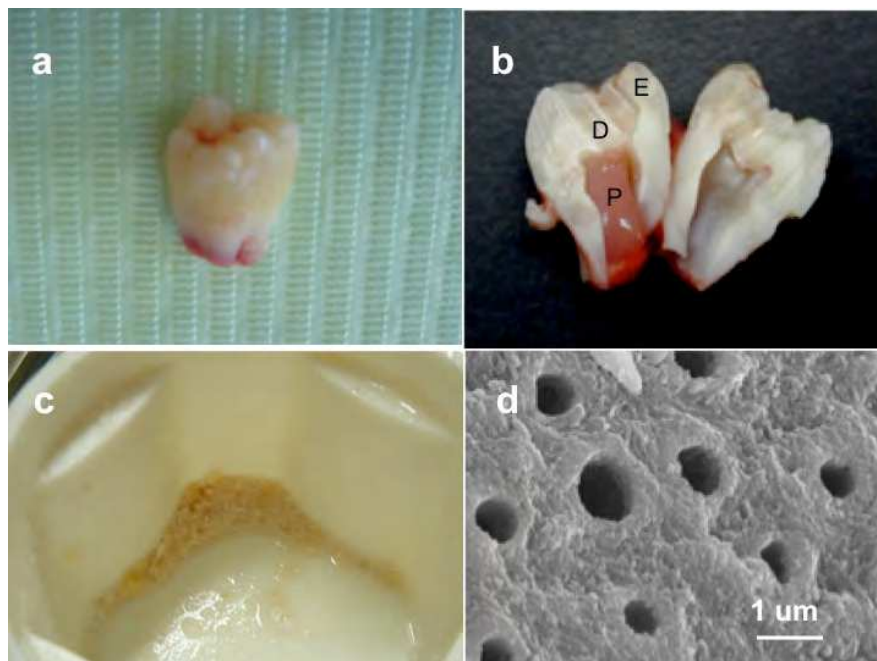
^{1,2,3}Япония

^{4,5,6}Ю. Корея

1. Введение

Использование дентина человеческих зубов в качестве аутографта было впервые описано в форме отчёта о клиническом случае в 2003 г. (Murata et al.), а аутографт из человеческой костной ткани был применен первый раз в 1820 г. Эти два события разделяют многие годы. В 2009 г. в Сеуле была основана компания Korea Tooth Bank, занимающаяся технологиями вторичного использования тканей зубов - так появилось новое направление в костной регенерации. В недавних экспериментах данные материалы проявили себя как реальная альтернатива костному аутографту. Регенерация утраченной костной ткани традиционно проводилась с использованием свежего костного аутотрансплантата (впоследствии к этому добавилась возможность применения синтетических и аллогенных заменителей костной ткани). Чтобы избежать процедуры взятия аутографта и связанного с этим травмирования организма, велись поиски альтернативных методов получения заменителей костной ткани (Kuboki et al., 1995; Asahina et al., 1997; Takaoka et al., 1991; Artzi et al., 2004; Kim et al., 2010). Также производились исследования в области биоинжиниринга (Wozney et al., 1988; Wang et al., 1990; Murata et al., 1999). Для процедур регенерации требуются биоматериалы, обеспечивающие формирование собственной костной ткани организма и замещаемые ею, то есть способные к абсорбции. Материалы, не обладающие такими свойствами, не могут быть замещены костной тканью и, таким образом, могут стать источниками постоянного воспаления, так как воспринимаются организмом как инородное тело. Поскольку и кость, и дентин на 10% состоит из воды, на 20% из коллагена и на 70% из гидроксилатапгита, прежде всего представляют интерес биоматериалы на основе коллагена и керамики (Murata et al., 2000; Murata et al., 2002; Akazawa et al., 2006; Murata et al., 2007). Удалённые у человека зубы обычно просто выбрасываются, причём внутри них и на них присутствуют патогенные микроорганизмы, попадающие в окружающую среду. Мы же считаем, что эти зубы могут принести пользу их бывшим обладателям и членам их семей (рис. 1). Мы обратили внимание на остеокондуктивные свойства дентина и его способность абсорбироваться организмом, и начали изучать возможность применения человеческих зубов в качестве источника аутографта для костной регенерации в Японии и Корее (Akazawa et al. 2007; Kim et al. 2010). Мы считаем, что биоматериаловедению следует обратить свое внимание на методы регенерации с использованием матриц натуральной зубной эмали и дентина и поддержать данное начинание.

В нашей статье мы познакомим читателя с новым биоматериалом для моделирования костной ткани на основе человеческого дентина, выступающего в качестве матрицы, содержащей рекомбинантный человеческий костный морфогенетический протеин-2 (RHBMP-2, далее сокращенно BMP-2).



a: Удалённый моляр

b: Зуб разделен вдоль: E - эмаль, D - дентин, P - пульпа.

c: Гранулы, полученные после измельчения зуба.

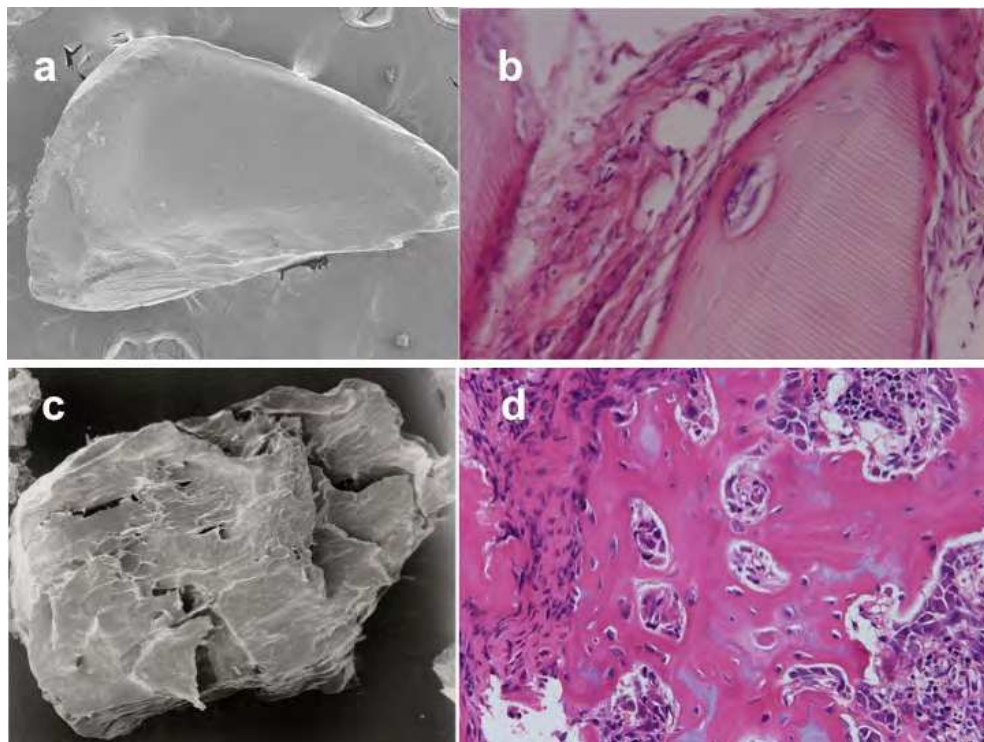
d: Электронная микроскопия частиц недекальцированного дентина. Отверстия на снимке - дентинные каналы.

Рис. 1. Человеческий "зуб мудрости"

2. Остеоиндуктивные свойства человеческого дентина

В 1967 г. остеоиндуктивные свойства кроличьего дентина подтвердились в опытах с имплантацией во внутримышечных карманах (Yeoman & Urist, 1967; Bang & Urist, 1967), после открытия данных свойств у кроличьей деминерализованной костной матрицы (DBM) в 1965 г. (Urist, 1965). Эксперименты с кроликами показали, что полностью деминерализованная дентинная матрица (DDM) демонстрирует индуктивные свойства по отношению к костной ткани по итогам 4 недель, в то время как при использовании недеминерализованного (то есть содержащего кальций) дентина, остеоиндукция наблюдалась лишь через 8-12 недель после его имплантации. В нашем исследовании, человеческая DDM, а также небольшие фрагменты натурального зубного цемента, полученные из одной из "восьмерок", а также человеческая DBM, взятая из бедренной кости, проявили остео- и хондроиндуктивные свойства, будучи размещенными подкожно на срок 4 недели (Murata et al., 2010a). Замедленная остеоиндукция данных матриц может быть обусловлена ингибированием высвобождения BMP кристаллами апатита. Более ранние исследования показали, что биологические ткани с высоким содержанием апатитов, такие как дентин и кортикальная пластинка, не вызывают остеоиндукцию быстрее, чем губчатая кость, DBM и DDM (Huggins et al., 1970).

Дентин и кость являются минерализованными структурами и сходны между собой по химическому составу. DDM и DBM состоят, главным образом, из коллагена (95%) с включениями небольшого количества факторов роста (Finkelman et al., 1990). Другими словами, DDM и DBM можно определить как нерастворимые в кислоте коллагеновые матрицы, содержащие костные морфогенетические протеины (BMP), которые входят в суперсемейство трансформирующего ростового фактора TGF- β . BMP были обнаружены в костной ткани (Urist, 1965; Sampath & Reddi, 1983) и способны проявлять остеоиндуктивные свойства, будучи помещенными в организм вне скелета (Murata et al., 1998). Животные BMP были получены с использованием раствора гуанидина гидрохлорида (4 моль) с частичной очисткой из биоматериала крыс, кроликов и коров (Butler et al., 1977; Urist & Mizutani, 1982; Kawai & Urist, 1989; Bessho et al, 1990). Кроме того, были измерены концентрации TGF- β , инсулиноподобного фактора роста I (IGF-I) и II (IGF-II) в человеческом деминерализованном дентине (DDM). Эти концентрации оказались на уровне (нг/мкг, в 4мольном растворе гуанидина гидрохлорида и этилендиаминтетрауксусной кислоты): TGF- β (0.017), IGF-I (0.06) и IGF-II (0.52). Все три фактора роста присутствовали в концентрациях более низких, чем в человеческой кости (Finkelman et al., 1990). В последующие годы в человеческом дентине и зубной пульпе были обнаружены оба типа BMP-2 (Ito et al., 2008).



- a: Электронная микроскопия 0,5 мкм частиц DDM: гладкая поверхность без трещин.
b: Остеиндукция через 4 недели после имплантации DDM.
c: Электронная микроскопия 0,5 мкм частиц DBM: на поверхности трещины и следы расположения кровеносных сосудов.
d: Остеиндукция через 4 недели после имплантации DBM.

Рис. 2. Деминерализованная дентинная (DDM) и костная (DBM) матрицы

Даже после деминерализации дентина, активные типы BMP остаются в структурах, богатых коллагеном, схожих с костью (Urist et al., 1973). Декальцинированный дентин (DDM) известен как более активная остеокондуктивная матрица, чем кальцинированный дентин (Yeoman & Urist, 1967). Этому способствует и специфический тип мембраны DDM (Inoue et al., 1986). Интересно также, что деминерализация кости и дентина повышает их остеоиндуктивность, но снижает их иммуногенность (Reddi, 1974). Эти факты чрезвычайно важны для получения графтов из твердых физиологических тканей (Kim et al., 2010; Murata et al., 2010a). Нерастворимая в кислоте дентинная матрица после деминерализации (DDM) - это органический, биоабсорбируемый материал, сохраняющий оригинальную структуру дентина. Человеческий DDM, приготовленный из живых удаленных зубов, был имплантирован под кожу четырехнедельной голей мыши с пониженным порогом иммуногенных реакций. DDM инициировал независимый рост костной и хрящевой ткани, подтвержденный через 4 недели после имплантации, как и в опытах с человеческой DBM (Murata et al., 2010b). Независимая дифференцировка клеток кости и хряща перекликалась с результатами нашего предыдущего исследования, когда для этой цели использовались керамический графт и коллаген в сочетании с BMP (Murata et al., 1998). Нерастворимый в кислоте коллаген, DBM и DDM обладают способностью к коагуляции безтромбоцитной гепаринизированной, а также обработанной цитратами или оксалатами плазмы крови (Huggins & Reddi., 1973). Составляющие кровяных сгустков денатурируются при контакте с нерастворимыми протеинами коагулята. Коагулирующие свойства DBM и DDM по отношению к плазме дают преимущество при хирургических операциях. Медицинские материалы на основе коллагена продаются и используются уже более 30 лет.

3. Примеры клинического применения человеческого дентина

3.1 Клинический случай 1: аугментация кости. Пациент 48 лет. Первый доклад об успешном клиническом применении DDM-аутографта для костной аугментации был сделан на 81й конференции IADR в Швеции в 2003 г. (Murata et al., 2003). Его целью было изучение образования костной ткани вокруг дентального имплантата, при установке которого был использован DDM графт (в процедуре синус-лифтинга).

Пациент

У пациента 48ми лет отсутствовали зубы 24, 26, 45 и 47. Клинический осмотр выявил атрофию кости верхней челюсти в соответствующих областях (рис. 3 и 4). В анамнезе пациента не было ничего примечательного.

Первый хирургический этап

Было удалено 4 зуба: 17, 18, 25 и 28. Два из них - 17 и 18 - были заморожены при температуре - 80°C для последующего получения DDM.

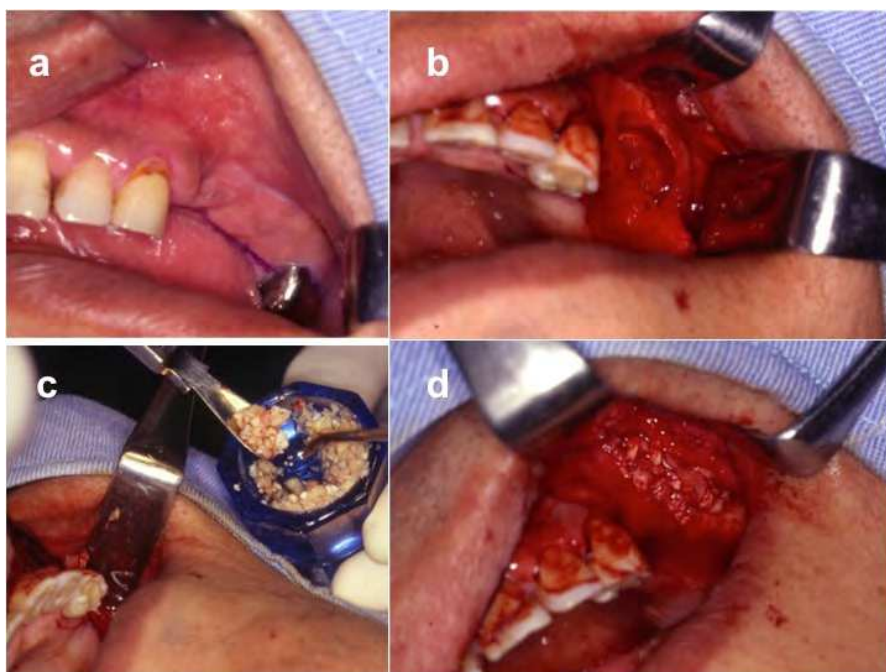
Приготовление DDM-аутографта

DDM аутографт был приготовлен из удаленных живых зубов 17 и 18. Зубы были измельчены в ступке в условиях охлаждения жидким азотом. Полученные частицы дентина были полностью декальцинированы в 0,6N растворе соляной кислоты. Частицы DDM с добавлением зубного цемента были тщательно промыты в холодной дистиллированной воде, а затем заморожены с последующей сушкой в вакууме (Murata et al., 2010a).

Второй хирургический этап

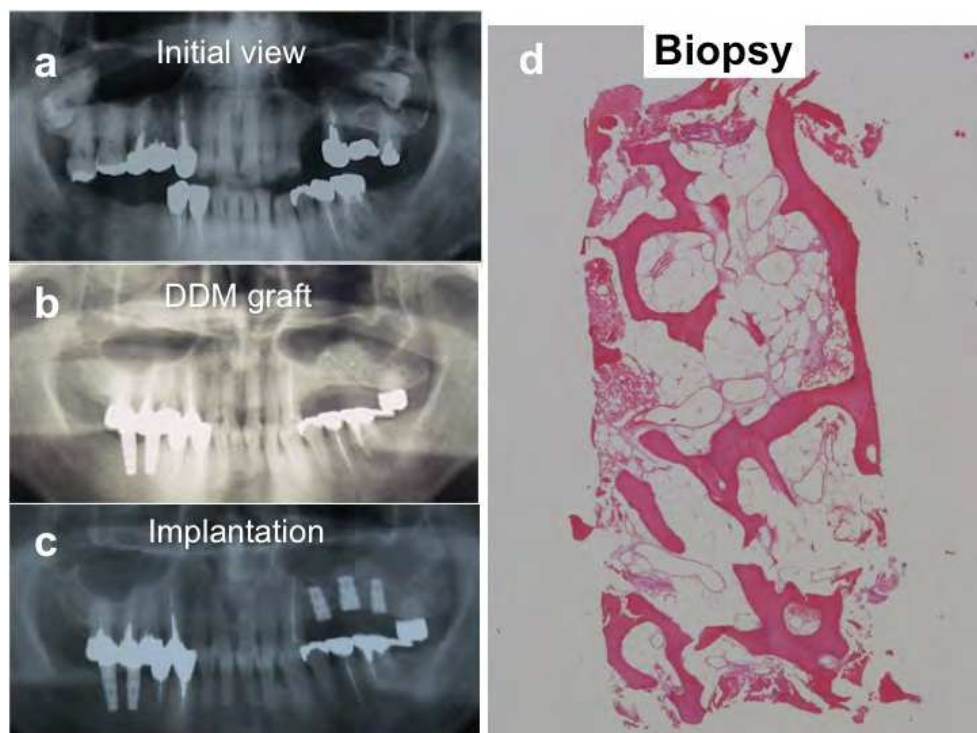
Синус-лифтинг производился с использованием сухого аутографта DDM для аугментации костной ткани (рис. 3).

Через 5 месяцев после операции, 3 имплантата (FLIALIT-2®, FRIADENT) были установлены в сформировавшуюся кость под местной анестезией (рис. 4с). В этот же момент была произведена биопсия костной ткани в месте имплантации (рис. 4д).



- a: Вид до операции: три отсутствующих зуба и атрофия кости верхней челюсти.
- b: Полость для заполнения аутографтом.
- c: DDM -аутографт, полученный из двух моляров.
- d: Вид полости после имплантации аутографта.

Рис. 3. Клинический случай 1: использование DDM аутографта при синус-лифтинге у 48летнего пациента



а: Радиография до вмешательства, б: через 4 месяца после имплантации DDM-графта, с: после установки зубных имплантатов, d: микроскопия сформировавшейся костной ткани с клетками костного мозга.

Рис. 4. Радиография и микроскопия биоптата

Итоги и обсуждение

Исследование биоптата показало, что он содержит зрелую костную ткань с включениями неабсорбированных частиц DDM (рис. 4d). Было обнаружено, что DDM постепенно абсорбировался организмом и замещался формирующейся костной тканью, способствуя заживлению места имплантации.

Выводы

После аугментации кости при помощи DDM-аутографта была произведена успешная имплантация. Данные результаты подтверждают, что аутогенный дентин может перерабатываться в инновационный биоматериал.

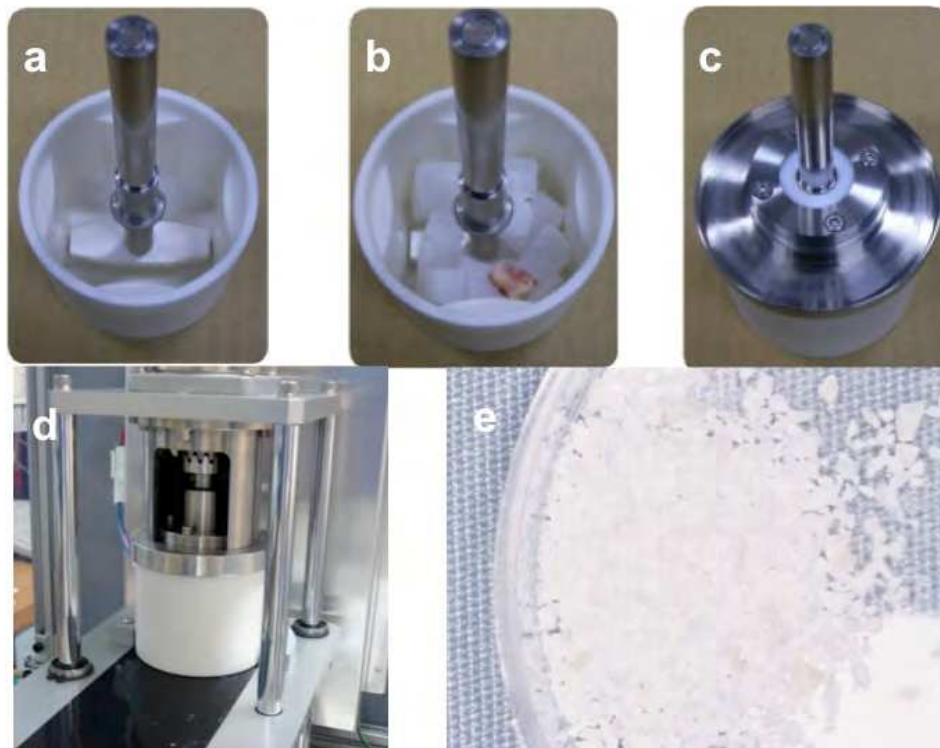
Клинический случай 2. Костная регенерация у женщины 58 лет.

У 58летней женщины отсутствовали зубы (12-22). Клинический осмотр выявил атрофию кости верхней челюсти на данном участке. В анамнезе не было ничего примечательного.

Приготовление DDM-аутографта

Аутографт был приготовлен из удалённого живого зуба №17. Зуб был измельчен с добавлением замороженного физраствора в нашей новой мельнице (DENTMILL®, Токуо Iken Co., Ltd) при частоте вращения ротора 12000 об./мин. в течение 30 с (рис. 5). Корпус и жернова мельницы изготовлены из оксидциркониевой керамики, одобренной FDA.

Керамика получена спеканием смеси порошка оксида циркония в форме при температуре 1400°C в течение 2 часов (рис. 5а). Свойства данного материала таковы: усадка при спекании - 21%; относительная плотность - 99%; прочность на изгиб - 400 МПа. Мельница предназначена для измельчения зубов или фрагментов кортикальной пластинки (1 см³) с добавлением кубиков замороженного физраствора (рис. 5б). Измельченный зуб был полностью декальцинирован в 0,26N растворе азотной кислоты в течение 20 мин. Частицы DDM с присутствием зубного цемента были тщательно промыты в холодной дистиллированной воде (рис. 5е) (Murata et al., 2009; Murata et al., 2010a).



а: мельница ZrO₂, б: зуб и замороженный физраствор в мельнице, с: нержавеющая крышка с ротором, d: внешний вид мельницы, е: частицы DDM, готовые к использованию.

Рис. 5. Приготовление DDM -графта с применением автоматической мельницы (DENTMILL®, Tokyo Iken)

Хирургическая процедура (2006 г.)

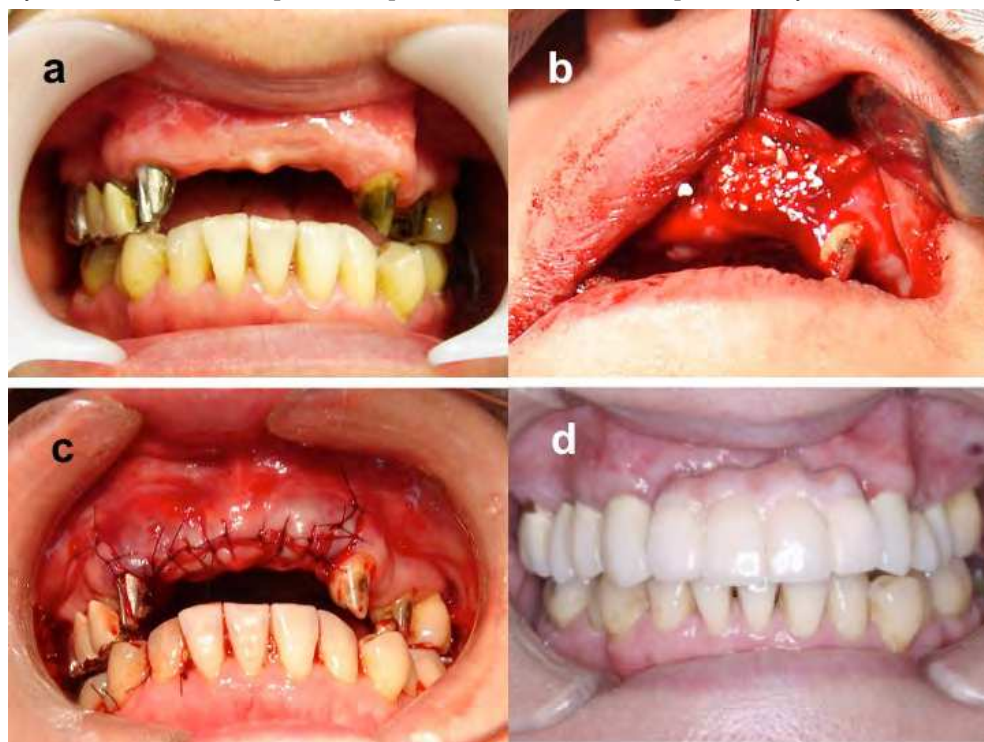
Было произведено расщепление кости верхней челюсти и сделаны отверстия в кортикальной пластинке, куда был помещён DDM-аутографт (рис. 6 а, b, с). Через 4 месяца после операции, 3 одинаковых имплантата (3,4×11 мм, FLIALIT-2® , FRIADENT) были установлены в аугментированную кость под местной анестезией (рис. 6b). В этот же момент была сделана биопсия костной ткани для исследования.

Итоги и обсуждение

Исследование биоптата показало, что DDM-графт был абсорбирован организмом, и в итоге была достигнута биологическая ширина кости в 4-6 мм. Частицы DDM, не успевшие пройти абсорбцию, можно было наблюдать при проведении остеотомии под имплантаты. Биопсия показала, что ремоделирование кости после аугментации DDM-графта занимает 4 месяца. Имплантация прошла успешно (рис. 6d). Хотя для подобных целей обычно используются ателоколлагенные материалы животного происхождения, мы смогли продемонстрировать, что частицы декальцинированной кислотонерастворимой коллагеновой матрицы, полученной из человеческого дентина, также является эффективным и безопасным биоматериалом.

Выводы

Частицы DDM, полученные из удаленных живых человеческих зубов, являются коллагеновыми матрицами, обладающими остеоиндуктивными свойствами, и человеческий дентин может быть переработан в аутогенный биоматериал для местного применения. Применение DDM в обоих случаях было одобрено Комитетом по этике Медицинского университета Хоккайдо. Участники экспериментов дали письменное согласие на их проведение, рассмотренное Комитетом по исследованиям с участием людей, одобрившим применение описанного протокола аугментации.



a: Отсутствие 4 зубов и атрофия верхней челюсти b: имплантация DDM-аутографта c: вид после наложения швов d: вид реставрации с опорой на имплантаты.

Рис. 6. Клинический случай 2: регенерация костной ткани у 58летней женщины

4. Дентин как матрица для человеческого рекомбинантного BMP-2

4.1 Рекомбинантные человеческие белки BMP

BMP-2 и BMP-7 при терапии состояний с вовлечением костной ткани, включая замедленное сращение или несращение кости. Препараты BMP-2 (Medtronic Co. Ltd.) и BMP-7 (Stryker Biotech Co. Ltd.) получили одобрение FDA для клинического применения на людях (показания: переломы и трещины длинных костей, регенерация межпозвоноковых дисков), при администрировании в составе очищенной коллагеновой матрицы или керамики. Кроме того, BMP-2 был одобрен для применения в ряде стоматологических процедур. BMP-7 также применяется при лечении хронических заболеваний почек. В 2002 г. компания Curis лицензировала BMP-7 для Ortho Biotech Products - подразделения Johnson & Johnson.

4.2 Акселерация остеоиндукции протеином BMP-2 в составе матриц из человеческого дентина

Целью проводимого здесь исследования была оценка увеличения потенциала остеоиндуктивности матрицы DDM, содержащей BMP-2, на модели подкожной имплантации соответствующего препарата крысам.

Состав препарата BMP-2 и DDM

100 мкл раствора рекомбинантного человеческого BMP-2 (с концентрациями BMP-2 0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 мкг) смешивалось с 70 мг человеческой DDM в стерильном шприце. Полученный препарат получил обозначение BMP-2/DDM. В качестве контрольного вещества использовалась чистая DDM в 100 мкл буферного раствора.

Результаты опытов на крысах

Четырехнедельным самцам крысы, под местной анестезией, в стерильных условиях, были сделаны подкожные имплантации указанных препаратов в области спины. На каждом животном было применено по три препарата BMP-2/DDM с разной концентрацией BMP-2 и контрольный препарат, не содержащий BMP. Препараты были извлечены через 3 недели и подготовлены к гистоморфологическому исследованию.

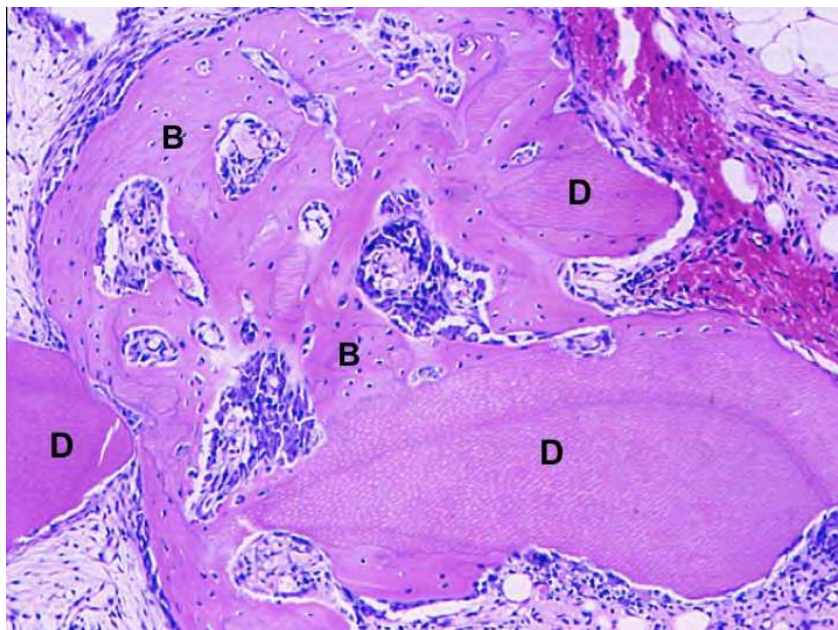
Гистологический и морфометрический анализ биоматериала через 3 недели после имплантации

В группе животных, которым производилась имплантация препарата BMP-2/DDM с концентрацией 5 мкг/70 мг, по истечении трех недель, наблюдалась развитая костная ткань с присутствием гемопоэтических клеток костного мозга. Хондроциты были обнаружены только в группах с концентрацией BMP-2 в 0,5 и 1,0 мкг (Таблица 1).

Группы с концентрациями BMP-2 в 2 и 0,5 мкг наиболее активно индуцировали рост костной ткани (рис. 7). В группе, где имплантировалась DDM без BMP-2, между частицами матрицы наблюдалось образование мезенхимальной ткани, и по итогам трех недель остеоиндукции не произошло (рис. 8). Морфометрический анализ продемонстрировал, что имеется положительная зависимость между объемом сформировавшейся костной ткани и клеток костного мозга, а также абсорбированного объема DDM, от дозы BMP-2 (Таблица 1).

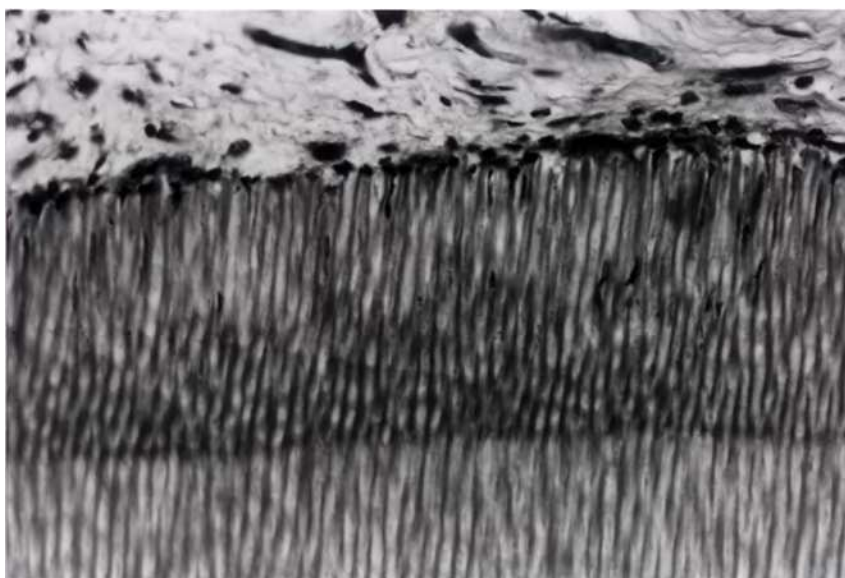
Выводы

BMP-2, содержащийся с коллагеновой матрице, полученной из деминерализованного человеческого дентина, активно способствует формированию костной ткани. DDM не ингибирует указанную активность BMP-2 и способствует проявлению его остеоиндуктивных свойств. Полученные результаты показывают, что данный биоматериал обладает уникальными свойствами и может эффективно применяться в качестве матрицы для администрирования BMP-2 в организм и субстрата для формирования клеток при моделировании костной ткани.



Кость (B), сформировавшаяся между частицами DDM (D). Видна дифференцировка остеобластов.

Рис. 7. Микроскопия биоптата из группы BMP-2 (5.0 мкг)/DDM (70 мг) через 3 недели после имплантации DDM-графта



Фибробласты на поверхности DDM-частицы. Видны дентинные каналы.

Рис. 8. Микрофотография DDM-частицы без BMP (70 мг) через 3 недели после имплантации DDM-графта

	Доза BMP-2 (мкг)				
	0	0.5	1	2	5
костная ткань	0	0	3.7 ± 1.41	7.4 ± 0.94	20.3 ± 4.64
хрящевая ткань	0	4.0 ± 0.81	2.3 ± 0.47	0	0
костный мозг	0	0	0	0	6.0 ± 1.63
DDM	57.0 ± 0.81	43.3 ± 3.39	41.0 ± 2.16	40.3 ± 1.69	37.0 ± 0.81
мезенхимальная ткань	40.7 ± 0.94	49.0 ± 5.09	48.0 ± 3.85	46.0 ± 2.16	32.7 ± 5.73
соединительная ткань	2.3 ± 0.47	3.7 ± 1.24	5.0 ± 0.47	6.3 ± 0.47	4.0 ± 0.81

Все ткани: 100 %, значения: средние ± отклонение, Количество животных: 9, Срок: 3 недели

Объем сформировавшейся костной ткани и костного мозга имеет положительную зависимость от дозы BMP.

Объем неабсорбированной DDM уменьшается с увеличением дозы BMP.

Таблица 1. Морфометрия зависимости роста тканей от концентрации BMP-2

5. Будущее биоматериалов

Появление новых биоматериалов оказывает значительное влияние на развитие регенеративной медицины и улучшение качества жизни пациентов. Нам выпала возможность разработать биоабсорбируемые и биосовместимые материалы - прежде всего, для ремоделирования костной ткани, с использованием ультразвуковых технологий и методов травления в кислотах (Akazawa et al. 2010). После внедрения, имплантируемые материалы начинают контактировать с жидкостями и клетками организма. Человеческие клетки не могут жить в безводной среде. Поэтому органы и ткани имеют пористую структуру для обмена жидкостями. Поверхность имплантируемого материала зачастую не предполагает проникновения в него физиологических жидкостей и клеток. Поэтому мы сосредоточили свои усилия на придании нашим материалам способности абсорбировать физиологические жидкости, а также на получении структур, способных адаптировать клетки организма (Murata et al., 2007). Физиологические жидкости могут проникать в коллагеновые матрицы, такие как DDM и DBM. Наш новый биоматериал на основе DDM может нести в себе человеческие факторы роста и адсорбировать протеины из физиологических жидкостей. К тому же, DDM с RGD-последовательностью, в качестве субстрата, способна поддерживать адгезию мезенхимальных клеток. Важно, чтобы изобретатели, исследователи, инженеры и врачи действовали сообща на ниве разработки новых функциональных биоматериалов - на благо наших пациентов.