

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,

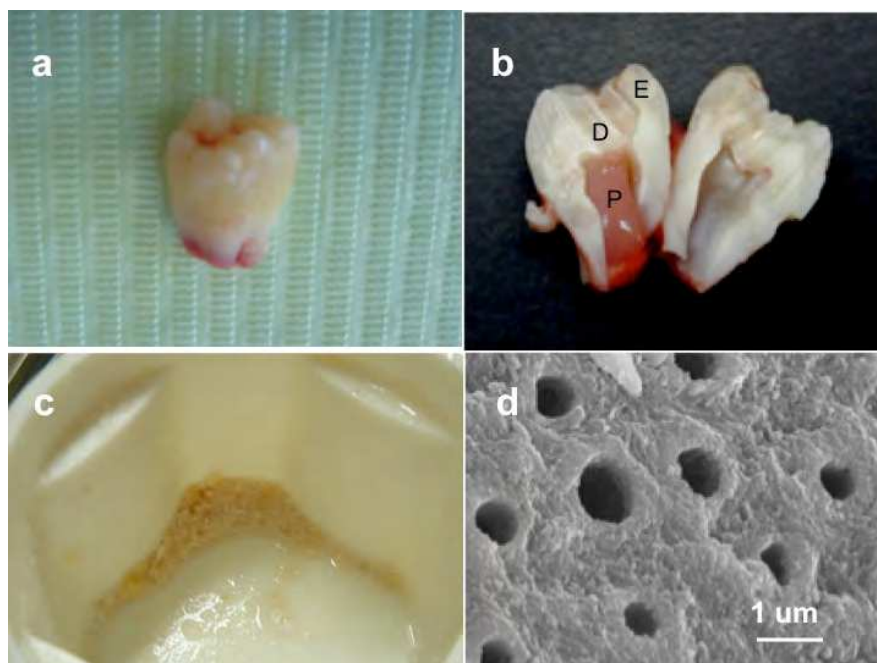
^{1,2,3}Япония

^{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.

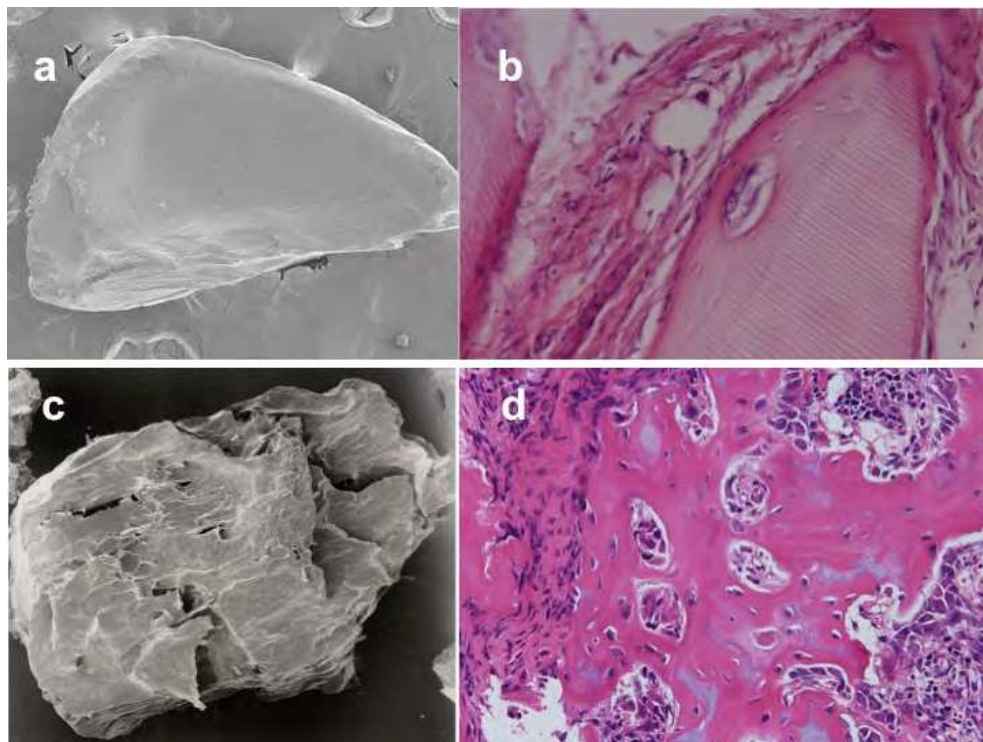
d: Электронная микроскопия частиц недекальцированного дентина. Отверстия на снимке - дентинные каналы.

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 остеиндукцию 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: Остеоиндукция через 4 недели после имплантации DDM.
c: Электронная микроскопия 0,5 мкм частиц DBM: на поверхности трещины и следы расположения кровеносных сосудов.
d: Остеоиндукция через 4 недели после имплантации DBM.

Рис. 2. Деминерализованные 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

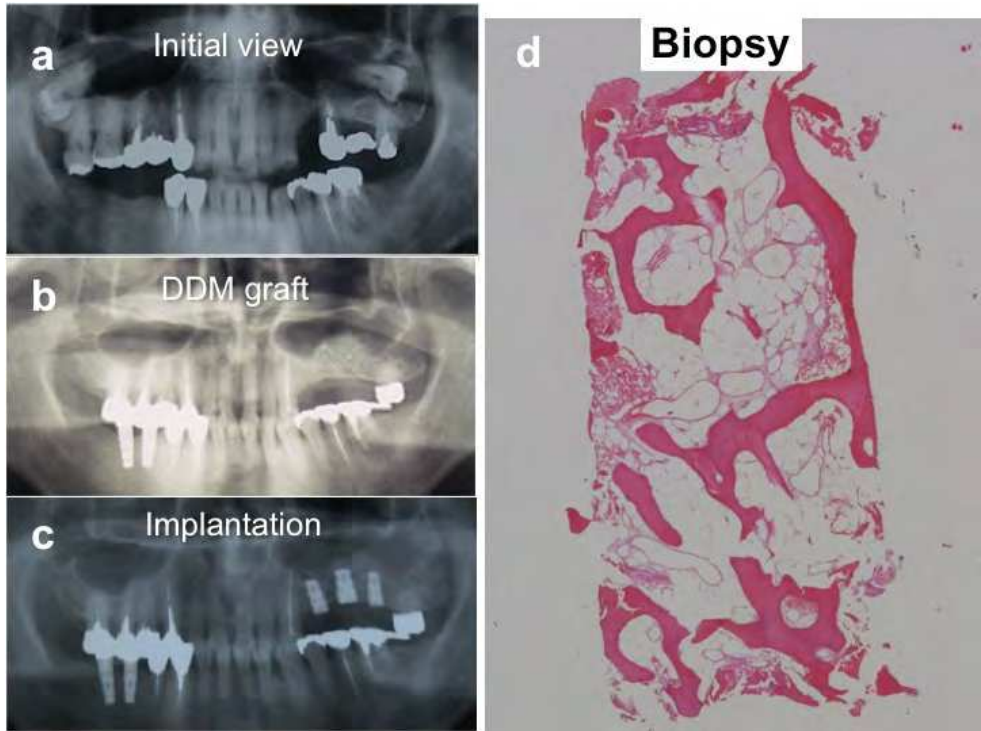
Было удалено 4 зуба: 17, 18, 25 и 28. Два из них - 17 и 18 - были заморожены при температуре - 80°C для последующего получения DDM.

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).



a: % 4 & b: c: d: , - & +

Fig. 4.

ž 88A fl "(X' ž 88A
 ž "
 88A! ž "
 " ž "

3.2 Case 2: Bone regeneration, 58 year-old woman

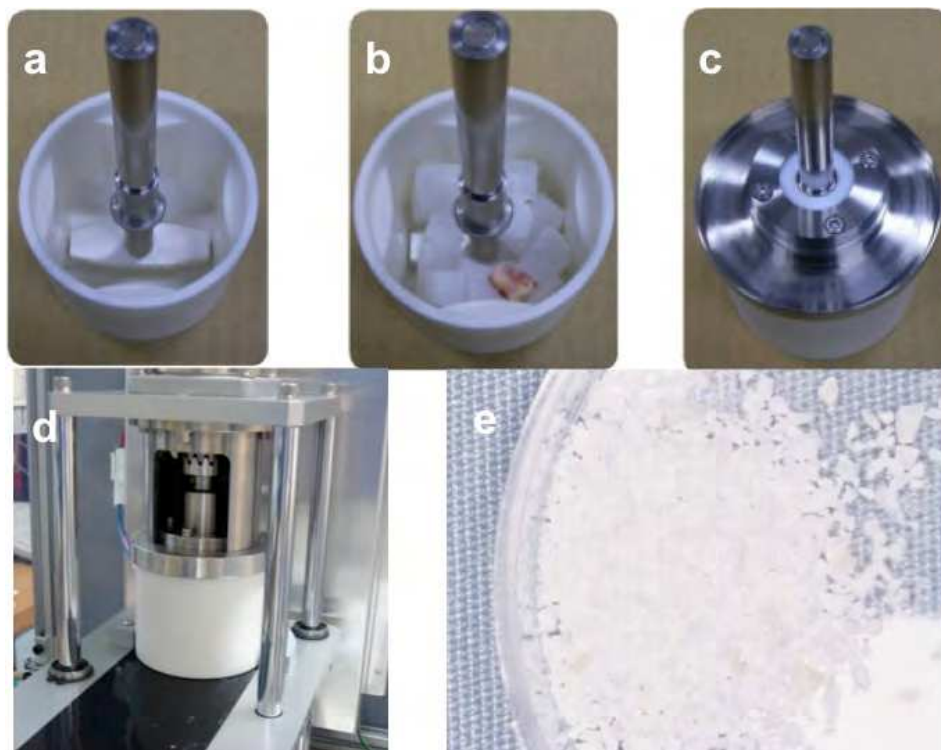
Patient

A 58-year-old female presented with missing teeth (#12-#22). A clinical examination revealed an atrophied upper jaw in the section. Her medical history was unremarkable.

Preparations of DDM

The autogenous DDM were obtained from a non-functional vital tooth (#17). The second molar was crushed with saline ice by our newly developed tooth-mill (DENTMILL®, Tokyo Iken Co., Ltd) at 12000rpm for 30 sec (Fig. 5). Briefly, vessel and blade were made in ZrO₂,

which have gained the approval of Food and Drug Administration (FDA) for human use. The ZrO_2 ceramics were fabricated by sintering at $1400^\circ C$ for 2 h after the slip casting of the mixture of ZrO_2 powder and distilled water (Fig. 5a). As the results of characteristics analyses of ZrO_2 objects, the contraction rate, the relative density, and the bending strength were 21%, 99%, and 400MPa, respectively. The automatic mill could crush a tooth and/or a cortical bone block ($1 \times 1 \times 1 cm^3$) under the condition of cooling using saline ice blocks ($1 cm^3$) (Fig. 5b). The crushed tooth granules were decalcified completely in 0.026N HNO_3 solution for 20 min. The DDM granules including cementum were extensively rinsed in cold distilled water (Fig. 5e), (Murata et al., 2009; Murata et al., 2010a).



a: ZrO_2 vessel and blade, b: tooth with ice blocks, c: stainless cover, d: mill, e: DDM granules before clinical use.

Fig. 5. Preparation of DDM using automatic tooth mill (DENTMILL®, Tokyo Iken)

Surgical procedure

Splitting osteotomy and cortical perforations were performed in the atrophied jaw and the autogenous DDM were transplanted to the treated bone in 2006 (Fig. 6a,b,c). At 4 months after the operation, 3 same fixtures (Synchro-stepped screw type: diameter; 3.4mm, length; 11mm, FLIALIT-2®, FRIADENT) were implanted into the augmented bone under local anesthesia (Fig. 6b). At the same time, bone biopsy was carried out for the tissue observation.

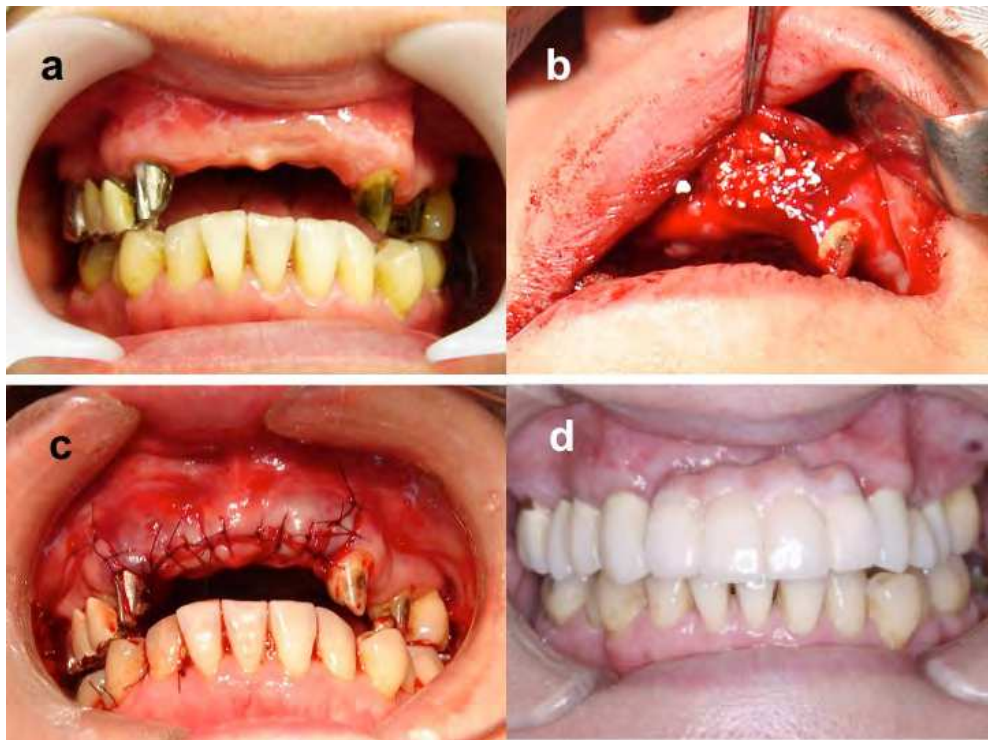
Results and discussion

The biopsy tissue showed that DDM granules were received to host and the biological width (4-6mm) was acquired. The DDM residues were partially observed during the implant placement. Bone biopsy revealed the DDM were remodeled by bone at 4 months. This patient was successfully restored with the dental implants after the DDM autograft (Fig. 6d). Though animal-derived atelocollagens have been generally used as medical materials, autogenous decalcified dentin is a highly insoluble collagenous matrix and a safe biomaterial.

Conclusion

Human DDM granules from vital teeth are collagenous matrices with osteoinductive potency, and the human dentin can be recycled as autogenous biomaterials for local bone engineering.

Case 1 and 2 were approved by the Ethical Committee in the Health Sciences University of Hokkaido. All subjects enrolled in this research have responded to an Informed Consent which has been approved by my Institutional Committee on Human Research and that this protocol has been found acceptable by them.



a: 4 missing teeth and atrophied upper maxilla b: DDM autograft before suture c: just after operation d: final view after prosthetic restoration using dental implantation

Fig. 6. Case 2: Bone regeneration, 58 year-old woman

4. Dentin scaffold for recombinant human BMP-2

4.1 Recombinant human BMP products

BMP-2, 4, and 7 are strong accelerating factors of bone induction. Currently, BMP-2 and BMP-7 have been shown in clinical studies to be beneficial in the therapy of a variety of bone-related conditions including delayed union and non-union. BMP-2 (Medtronic Co.Ltd.) and BMP-7 (Stryker Biotech Co.Ltd.) have received Food and Drug Administration (FDA) approval for human clinical uses (fractures of long bones, inter-vertebral disk regeneration), by delivery in purified collagen matrix or ceramics. Moreover, the BMP-2 product has been approved for certain dental applications. BMP-7 has also found use in the treatment of chronic kidney disease. In 2002, Curis licensed BMP-7 to Ortho Biotech Products, a subsidiary of Johnson & Johnson.

4.2 Acceleration of bone induction by BMP2 in human DDM scaffold

The aim of the following study was to estimate the increase of the bone-inductive potency by DDM combined with BMP-2 in rat subcutaneous tissues.

Composition of BMP-2 solution and DDM

One hundred micro-liter of recombinant human BMP-2 solution (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 μ g of BMP-2) was mixed with 70 mg of human DDM in a sterilized syringe. The composite was called as the BMP-2/DDM. The DDM alone with 100 μ l of PBS was also prepared as a BMP-free control.

Bioassay in rats

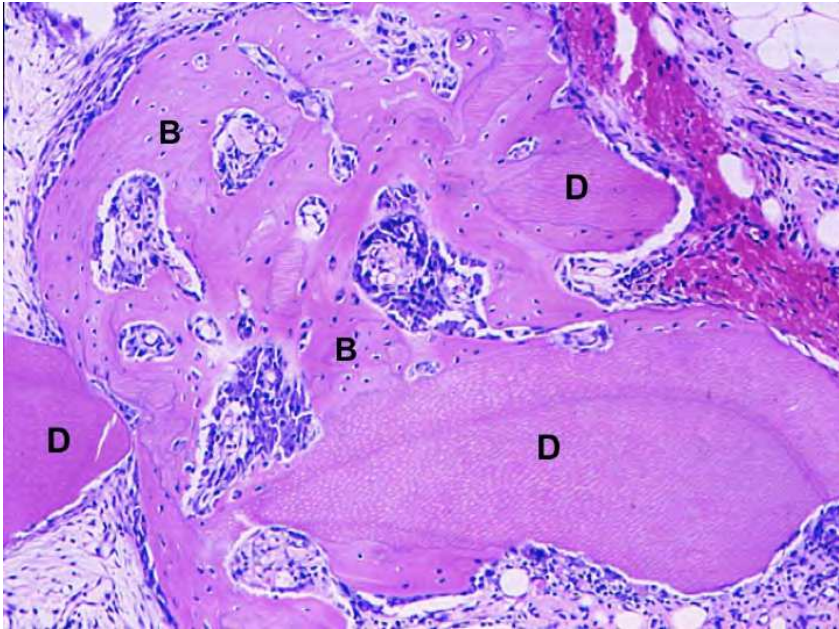
Wistar rats (male, 4 week-old) were subjected to intraperitoneal anesthesia and incisions were added to the back skin under the sterile conditions. Each animal received three BMP-containing composites (BMP-2/DDM) and one BMP-free control (DDM alone). The implanted materials were removed at 3 weeks after implantation, and prepared for histomorphological examinations. All procedures were followed the Guidelines in Health Sciences University of Hokkaido for Experiments on Animals.

Histological findings and Morphometric analysis at 3 weeks

In the BMP-2 (5.0 μ g)/DDM (70mg) group, bone with hematopoietic bone marrow developed extensively at 3 weeks. Chondrocytes were found only in the BMP-2 (0.5, 1.0 μ g)/DDM groups (Table 1). The BMP-2 (2.0, 5.0 μ g)/DDM groups accelerated bone induction predominantly (Fig. 7). In the DDM alone group, mesenchymal tissue was seen between DDM particles, and hard tissue induction was not observed at 3 weeks (Fig. 8). Morphometric analysis demonstrated that the volume of the induced bone and marrow increased at BMP-2 dose-dependent manner, while the DDM decreased at the dose-dependent (Table 1). Briefly, the volume of the bone and marrow in BMP-2 (1.0 μ g)/DDM and BMP-2 (5.0 μ g)/DDM showed 3.7% and 26.3%, respectively. BMP-2 (0.5 μ g)/DDM showed 0.0% and 4.0% in the volume of bone and cartilage, respectively.

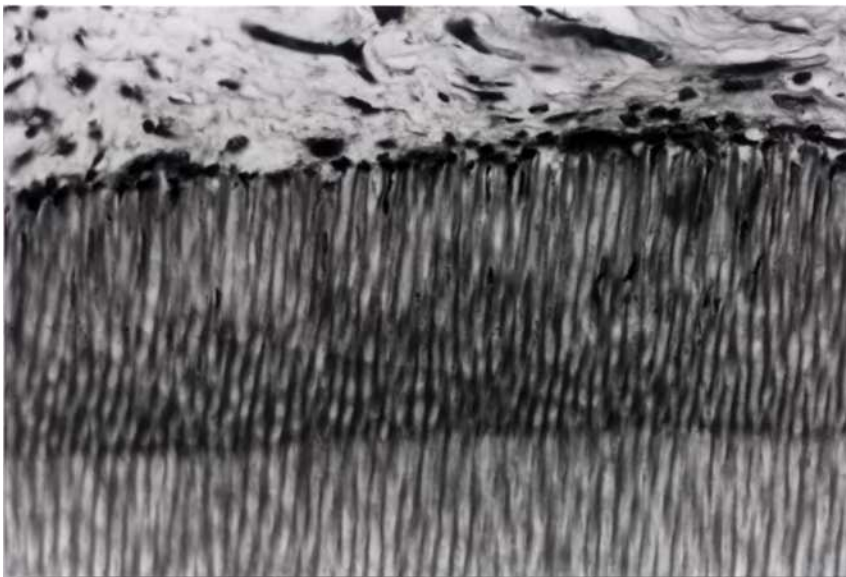
Conclusion

BMP-2 strongly accelerated bone formation in the DDM carrier system. DDM never inhibited BMP-2 activity and revealed better release profile of BMP-2. These results indicate that human recycled DDM are unique, absorbable matrix with osteoinductivity and the DDM should be an effective graft material as a carrier of BMP-2 delivering and a scaffold for bone-forming cells for bone engineering.



Induced bone (B) bridging between DDM (D) granules. Note: active osteoblast differentiation.

Fig. 7. Photograph in BMP-2 (5.0 μ g)/DDM (70mg) at 3 weeks



Fibroblasts on surface of DDM granule with original dentinal tubes.

Fig. 8. Photograph in DDM (70mg) alone at 3 weeks

	Dose of BMP-2 (μg)				
	0	0.5	1	2	5
bone	0	0	3.7 ± 1.41	7.4 ± 0.94	20.3 ± 4.64
cartilage	0	4.0 ± 0.81	2.3 ± 0.47	0	0
bone marrow	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
mesenchymal tissue	40.7 ± 0.94	49.0 ± 5.09	48.0 ± 3.85	46.0 ± 2.16	32.7 ± 5.73
connective tissue	2.3 ± 0.47	3.7 ± 1.24	5.0 ± 0.47	6.3 ± 0.47	4.0 ± 0.81

All tissue: 100 % , values: mean \pm SD , N: 9, Explanted time: 3 weeks

The volume of bone and marrow showing a dose-dependent increase.

The volume of DDM showing a dose-dependent decrease.

Table 1. Morphometry of BMP-2 dose-dependent study.

5. Material science for patients in the near future

Biomaterials have had a major impact on the regenerative medicine and patient care for improving the quality of lives of human.

We have been challenging to be able to develop bioabsorbable materials, harmonized with living body, especially bone remodelling, using an innovative supersonic and acid-etching technology (Akazawa et al. 2010). Implanted biomaterials first contact to body fluid and cells. Human cells never live in dry condition. Generally, organ and tissue have interconnected porous structure for dynamic flow of body fluid. Material walls inhibit the body fluid permeation and the cell invasion. Therefore, we focused on the permeability of body fluid into the bulk of materials and the biomimetic structure for the living and working cells (Murata et al., 2007). Body fluid can permeate into collagenous materials such as DDM and DBM. Novel DDM material contains native growth factors, and adsorbs several proteins derived from body fluid. In addition, DDM with RGD sequences supports mesenchymal cell adhesion as anchorage matrix.

Most importantly, material scientists, engineers, and doctors must work together and cooperate as professionals for the development of functional materials and for the present and future of all patients.