

# Sledovanie osteogenetickej aktivity naturálnych autológnych tvrdých zubných tkanív ako kostného augmentačného materiálu v in vitro a in vivo podmienkach

## Monitoring of osteogenic activity of natural autologous hard dental tissues used as bone augmentation material in vitro and in vivo conditions

**Kučera, J., Březina, V., Vaňek, J.**

MUDr. Ján Kučera, PhD., STONEK s.r.o., Krivá 23, Košice

Ing. Vitěslav Březina, CSc. Vývojové pracoviště Stomatologické kliniky, LF MU Brno, ČR

prof. MUDr. Jiří Vaňek, CSc., Stomatologická klinika LF MU a FN u sv. Anny, prednosta prof. MUDr. Lydie Izakovičová Hollá, PhD., Pekařská 53, Brno, ČR

### Abstrakt

Cieľom práce bolo hodnotenie osteogenetického potenciálu rozomletého naturálneho autológneho tvrdého zubného tkaniva (TZT) v laboratórnych a klinických podmienkach. Technológia spracovania autológneho TZT bola predaná pre účel využitia v experimentálnej a klinickej praxi v rokoch 2013 – 2014. Náš príspevok zhrňuje štvorročné poznatky s týmto materiálom (2014 – 2017) v rámci v in vitro sledovania, kedy bola experimentálne modelovo hodnotená s cieľom zaznamenania základných bukových interakcií pri využití techniky „Live cell dynamic imagination“. Bola pozorovaná výrazná stimulácia zrn TZK, ktorá sa prejavila zvýšenou lokomóciou buniek MG 63 a migráciou smerom k týmto zrnám. Medzi zrnami bola po niekoľkých dňoch vytvorená bunková vrstva so špecifickým chovaním a zarastaním priestoru medzi zrnami. Sledovanie in vivo v klinických podmienkach využitia autológnej drte TZK ako augmentačného materiálu v indikácii náhrady absentovaného kostného volumu priniesla pozitívne výsledky z hľadiska osteoindukčného a osteokondukčného efektu. Jednoduchý protokol prípravy, minimálna imunitná odozva, rýchla organizácia novovytvorenej, denznej kosti s optimálnymi mechanickými vlastnosťami a minimálne objemové zmeny v hodnotenom časovom období dovoľujú konštatovať, že ide o perspektívny augmentačný materiál porovnateľný, v mnohých ohľadoch majúci i lepšie kvalitatívne vlastnosťami ako iné špičkové augmentačné materiály.

**Kľúčové slová:** kostné augmentačné materiály, naturálne autológne tvrdé zubné tkanivá, osteogenetický potenciál, bunky MG 63.

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the osteogenic potential of natural autologous hard dental tissue (HDT) in laboratory and clinical conditions. Technology of autologous HDT processing was introduced for use in experimental and clinical practice in 2013 -2014. Our contribution summarizes the four-year experience with this material (2014-2017) as a part of the in-vitro monitoring, when it was experimentally assessed as a model with the aim to monitor basic cell interactions using “Live cell dynamic imaging”. Significant stimulation of HDT grains was observed. This was manifested by increased locomotion of MG 63 cells and migration towards the grains. In a few days, a cell layer had formed

between the grains with specific behaviour and closed the space between the grains. In vivo monitoring (in clinical conditions) of autologous bone grafting material of HDT, used as augmentation material in replacement of the absent bone volume, positive results were observed in a form of osteoinductive and osteoconductive effects. A simple preparation protocol, minimal immune response, rapid adoption of the newly created dense bone with optimal mechanical properties, and minimal volume changes during the assessment period, allow us to conclude that this is the prospective augmentation material with comparable or even better qualitative properties than other first-class augmentation materials.

**Key words:** bone augmentation materials, natural autologous hard dental tissues, osteogenic potential, MG 63 cells.

## Úvod

Problematika straty kostného volumu zohráva stále väčšiu rolu pri plánovaní implantačnej liečby. Tematike je venovaná veľká pozornosť vo svetovej odbornej literatúre. Výskum sa zameriava na sledovanie prípravy a využitia rôznych typov materiálov humánneho či xenogénneho pôvodu a ich osteogénnej aktivity [5]. Tkanivové inžinierstvo, ako nový koncept v regeneratívnej medicíne, hľadá a využívajú mnohokrát kombináciu kmeňových buniek, partikul a rastových faktorov, zaznamenáva v tejto oblasti výrazný progres [24]. Jednou z alternatívnych zdrojov augmentačného materiálu môžu byť extrahované zuby. Zvlášť dentín, tvoriaci cca 75 % objemu zuba, je so svojím unikátnym zložením podobným kostnému tkanivu pre tento účel veľmi vhodný [11, 17]. Obsahuje 20 % vody, 50 % minerálnych látok /apatito-amorfný trikalciumpfosfát, hydroxyapatit/, 30 % tvoria organické látky. Organická dentinová matrix, syntetizovaná odontoblastami, je mineralizovaná organická zložka. Obsahuje makromolekuly typické pre spojivové tkanivo ako kolagén v prevažnej miere 1. typu /90 %/ charakteristický pre kostné tkanivo, ktorý je sieťového charakteru s kryštalickými depozitmi, non – kolagénny proteín /ďalej NCPs/, kyselinu ethylendiamintetraoctovú /EDTA/, látku významnú svojím indukčným vplyvom na dentinogenézu [10, 20, 21]. Ďalej proteoglykány, glykoproteíny, lipidy, proteíny špecifické pre dentín /DPP - dentin phosphoprotein, DSP - dentin sialoprotein/, dentin matrix protein /DMP1/, kostné sialoproteíny, osteokalcin, osteopontin a osteonectin. Významný je obsah rastových faktorov /GF - Growth Factors/, ako transformujúci rastový faktor (TGF- $\beta$ 1), insulin rastový faktor (IGF), kostný morphogenetický proteín (BMP), angiogenický rastový faktor (AGF). GF umožňujú sekundárne buď rozvoj dentínovej degenerácie, alebo naopak, stimulujú reparatívnu dentinogenézu [3, 4, 7].

Odborné štúdie zamerané na sledovanie prínosu dentínu v procese tkanivovej regenerácie vyzdvihujú obzvlášť význam organickej zložky. Konštatujú prínos pri dentinodenzácii, reparatívnych procesoch v dentíne a osteogenéze. Má osteokondukčný

a osteoindukčný efekt, protizápalový účinok, podieľa sa na indukcii diferenciácie buniek dentálnej papily na odontoblasty.

Tabatabaei a kol. vo svojej systematickej štúdií [25] vychádzajúcej so spracovania 1045 prác za obdobie 2000 – 2016 determinuje oblasti vedeckého sledovania problematiky autológneho, heterológneho a xenogénneho dentínu do dvoch oblastí. Štúdie sledujúce osteogenetickú aktivitu dentínu v *in vitro podmienkach*, vplyvu rôznych foriem dentínu na diferenciáciu buniek cementoblastov, chondroblastov, osteoblastov a v *in vivo* – vplyv partikul autológnej dentínovej demineralizovanej matrix /ADDM/, denaturovaného dentínu, demineralizovaného dentínu na osteogenézu.

Druhou skupinou sú štúdie sledujúce prípravu dentínu ako *metódy zamerané na prípravu dentínu extrahovaním NCPs* /napr. pomocou Guanidín Cl+EDTA [19], EDTA+MTA+ CaOH<sub>2</sub>, EDTA+ CaOH<sub>2</sub>, EDTA/ [26], *demineralizácia dentínu* /napr. pomocou EDTA+ zmeny pH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> +EDTA, HCl +chloroform, EDTA ~konc., etanol + EDTA+ HCl+LIN (liquid dusík), LIN, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+etanol+éter/, *denaturácia dentínu elimináciou organickej matrix* /napr. var vo vode a izopropanole, var vo vode a sintrovanie pri 1150 st.C./, *príprava a použitie neupraveného autológneho dentínu* [8].

Príprava a použitie naturálneho, neupraveného autológneho dentínu je známa už niekoľko rokov. Pôvodne sa často využíval ako komparatívna vzorka pri hodnotení rôznych augmentačných materiálov či foriem upravovaného dentínu. V mnohých prípadoch, pri nesignifikantnosti rozdielov, bol však konštatovaný prínos naturálneho dentínu a viacerí autori zamerali svoj záujem na výskum ostrogénnych aktivít autológneho dentínu. [15, 16] Využívaný je len samotný dentín, resp. len koreňový dentín, či celý koreň po odstránení korunky, alebo celé zdravé zubné tkanivá.

## Materiál a metodika

Technológia využitia autológnej TZT pre augmentáciu kostných defektov bola predaná klinickej praxi

v období 2013 a 2014. Metodika spracovania a prípravy dentínovej drte prezentovaná Bindermanon a kol. v 2014 [2] je založená na rozomletí extrahovaných zubov a aplikácii preosiatej drte o veľkosti približne 300 – 1200  $\mu\text{m}$ . Extrahované zuby, ktoré neboli endodonticky ošetrené, zbavené všetkých mechanických nečistôt, výplní a podobne, sú následne rozomleté v dentínovom mlynčeku na zrno požadovanej veľkosti. Následne je drť chemicky dezinfikovaná v roztoku 0,5M NaOH a 20 % alkoholu po dobu 10 minút a následne opakovane premývaná vo fyziologickom roztoku. Finálny produkt pripravený k aplikácii sme sledovali in vivo a in vitro.

#### **Experimentálna časť. In vitro studia**

Pre účely experimentu boli použité bunky MG63 pôvodom z osteosarkómu, zo zbierky (ECACC č.86051601). Bunky boli kultivované v termostate pri 37°C a atmosfére 5 % CO<sub>2</sub> v prostredí s relatívnou vlhkosťou 95 %. Tak bola produkovaná pokusná kultúra následne podrobená časozbernej analýze [1].

Live cell dynamic imagination: Technika časozbernej mikrokineematografie bola vykonávaná zariadeniami NIKON Biomat, pre paralelné sledovanie viacerých zorných polí z jednej pokusnej misky a OLYMPUS IC pre dlhodobejšie pokusy v prietokovej kultivácii alebo v kultivácii s výmenou živného média. Výsledkom tejto techniky sú postupné fotografie vo formáte jpg, komprimované do videí, pokiaľ je požadované prípadné kvalitatívne hodnotenie snímok. To spočíva v okienkovej projekcii so súčasným meraním či počítaním tak, aby boli stanovené kvantitatívne parametre pre porovnávanie.

#### **Klinická časť. In vivo**

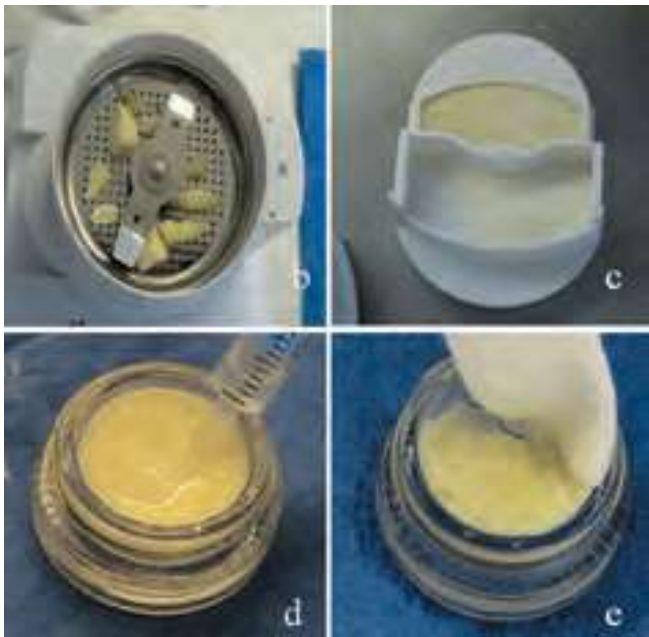
Metodika využívaná od roku 2014 v našej klinickej štúdií bola modifikovaná oproti pôvodnému Bindermanovmu protokolu v niektorých bodoch. Na účely klinickej štúdie sme použili všetky zachované zdravé TZT.

Nami preferovaný postup spočíval buď vo využití aktuálne extrahovaných zubov a okamžitej aplikácii drte TZT mechanickým očistením, rozomletím a dezinfekciou, alebo využitím už extrahovaných zubov, uchovávaných po extrakcii v zmrazenom stave v Tkanivovej banke pri -70 st. C., ktoré boli pred použitím rozmrazené. Na rozdiel od pôvodného protokolu sme nepoužívali zuby v stave vysušenom z dôvodu zachovania osteogenetických vlastností organických komponent dentínovej matrix. Z dôvodu potencovania reparatívnych procesov v priebehu hojenia sme využívali PRP /Platelet-Rich Plasma - plazma bohatá na trombocyty/. Jej význam v procese hojenia je pri riadenej kostnej regenerácii v implantológii známy a táto metóda je vo svete široko využívaná [23]. Na naše účely sme

využívali metódu neaktivovanej PRP, resp. PRF /Platelet – Rich Fibrin - fibrín bohatý na trombocyty/. Spracovaný materiál pripravený na použitie bol vždy pred použitím zmiešaný s PRP. Pred aplikáciou materiálu bola oblasť aplikácie prepláchnutá 5 % roztokom Metronidazolu. Zákroky boli vykonávané pod celkovým antibiotickým krytím s dôrazom na pooperačnú antiedémovú terapiu. Počas štvorročného obdobia sledovania /2014 – 2017/ bolo vykonaných 192 operačných výkonov u 108 pacientov z toho 68 žien. Prevažnú časť výkonov tvorili chirurgické extrakcie zubov múdrosti /68 zákrokov u 48 pacientov/ s následnou okamžitou augmentáciou lôžka. Soccet preservation /54 prípadov/, vertikálna a horizontálna ridge preservation /36 prípadov/, sinus lift /10 prípadov/ boli vykonávané buď s využitím TZT zubov aktuálne extrahovaných, alebo uchovávaných v zmrazenom stave častokrát v zmesi s xenogennými materiálmi bovinného pôvodu. V 6 prípadoch bola vykonávaná GBR /riadená kostná regenerácia/ z parodontologických indikácií, v 18 prípadoch bol materiál využitý pri resekciiach koreňového hrotu, cystektómiach a pri hemisekciách. Augmentáty boli po aplikácii prekryté kolagénymi resorbovateľnými bariérovými membránami, v 12 prípadoch, pri vertikálnej a horizontálnej ridge preservation, bola použitá neresorbovateľná titánova mriežka. Membrány po aplikácii boli následne prekryté vrstvou PRF s následnou sutúrou. Priemerná doba hojenia bola 6 – 8 dní.







**Obr. 1.** Mlynček na dentín (Smart Dentin Grinder) fa. Kometabio Inc. (a), mechanicky očistené zuby prepravené na mletie (b), dentínová drť veľkosti 300 - 1200um (c), dezinfekcia (d) a premývanie fyziologickým roztokom (e).

**Fig. 1.** Smart Dentin Grinder by fa. Kometabio Inc. (a), mechanically cleaned teeth prepared for grinding (b), dentin grafting material in size of 300 - 1200um (c), disinfection (d), washing in a physiological solution (e).



**Obr. 2.** Príprava PRP (a) a PRF (b), zmiešanie augmentačného materiálu s PRP (c), PRF membrána pred použitím (d)

**Fig. 2.** Preparation of platelet-rich plasma (PRP) (a) and platelet-rich fibrin (PRF) (b), mixing of augmentation material with PRP (c), PRF membrane before use (d)

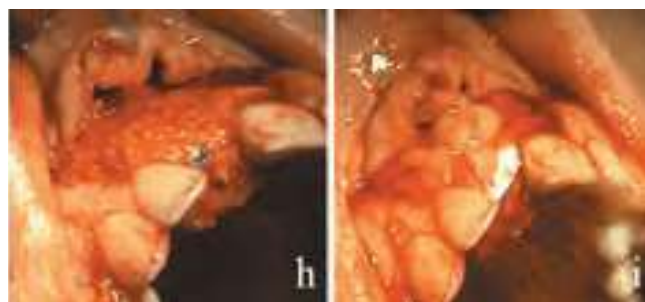
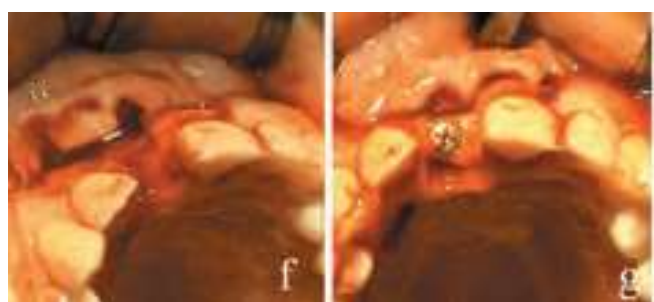
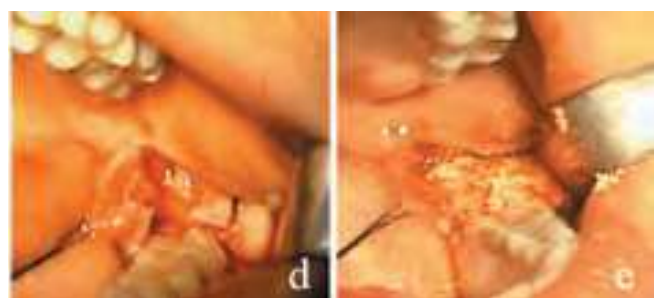
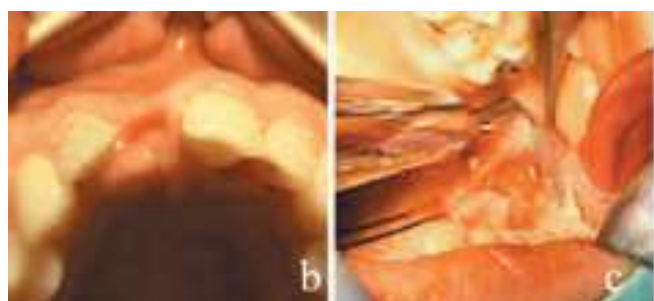
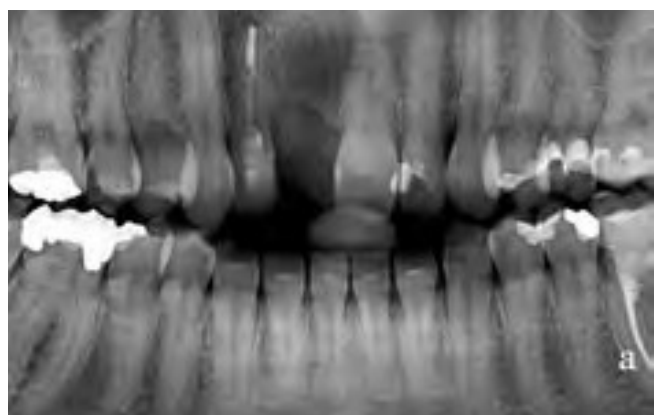
V rámci klinickej časti uvádzame niekoľko príkladov využitia a ich hodnotenie.



**Obr. 3.** 28-ročný pacient - stav 2 mesiace po chirurgickej extrakcii, 48 bez augmentácie, pred plánovanou extrakciou 38. Extrakcia

a augmentácia autológou drťou TZT zuba 38 (b, c, d). 3 mesiace po zákroku (e) – prítomná dostavba kosti v reg. 38, v reg. 48 pretrváva dostavba v nedostatočne miere. Príprava zuba 38 na mletie (f). Augmentačný materiál zmiešaný s PRP pripravený k aplikácii (g).

**Fig. 3.** A 28-year-old male patient – state two months after surgical extraction of the 48 without augmentation, before the extraction of the 38. Extraction and augmentation with autologous grafting material of the tooth 38 (b, c, d). Three months after intervention (e) – bone augmentation present in region 38, insufficient bone growth in region 48. Preparation of the tooth 38 for grinding (f). Augmentation material mixed with PRP ready for application (g).

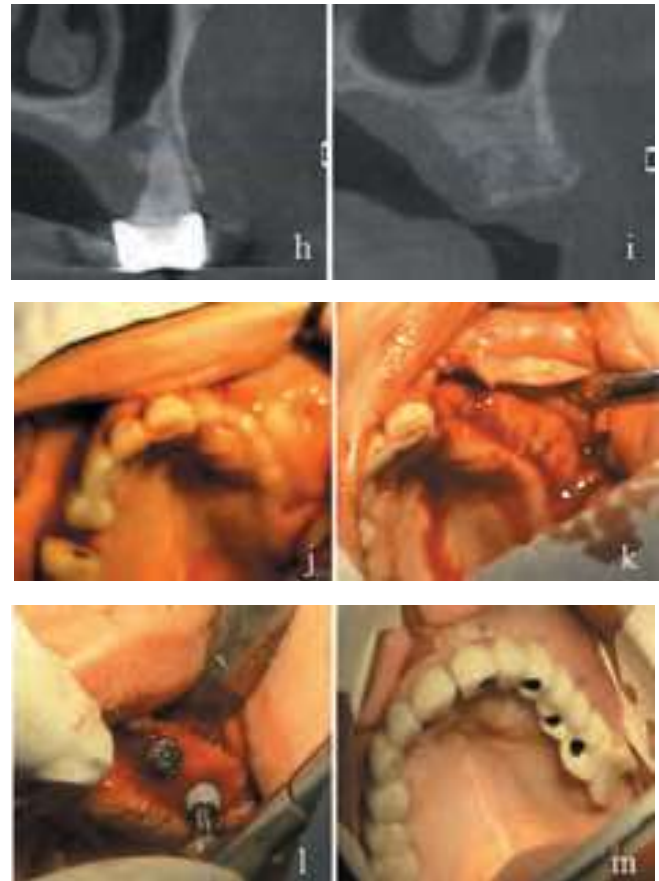
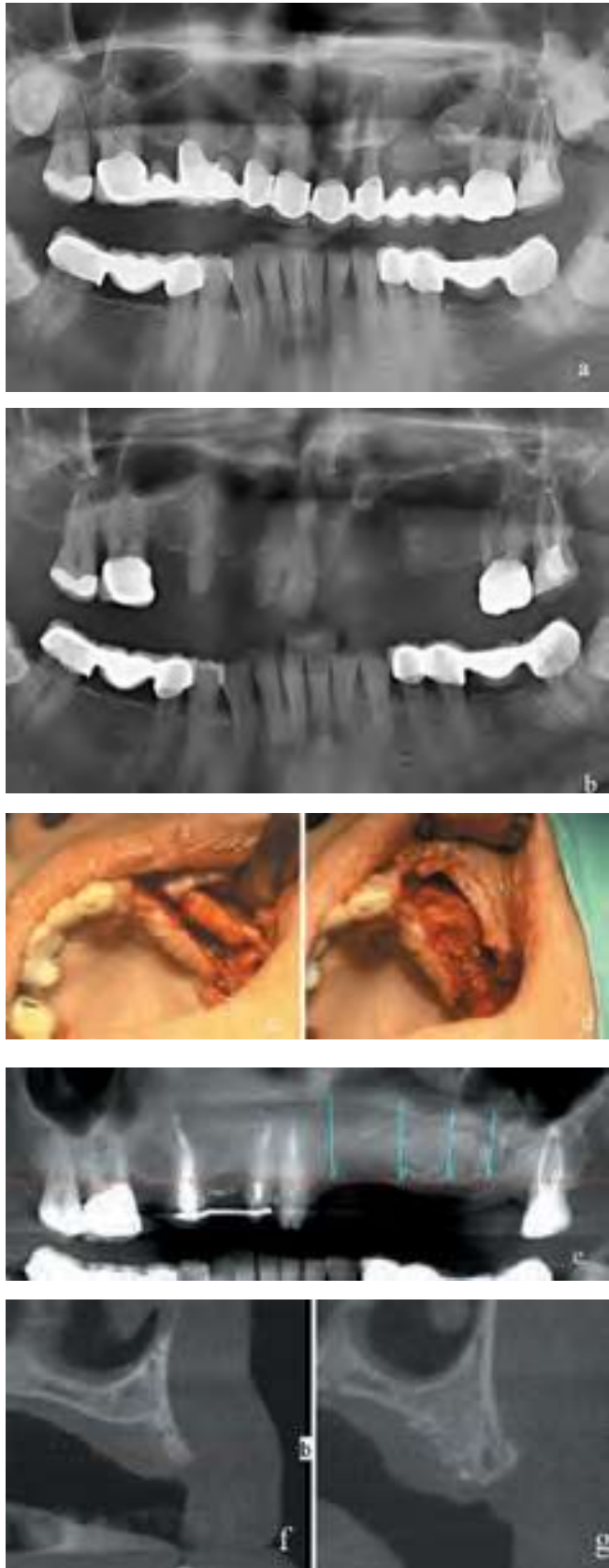


**Obr. 5.** 28-ročná pacientka s chronickou fistuláciou reg.11(a) po opakovaných resekciách a extrakcii 11. Vertikálna a horizontálna strata alveolárnej kosti(b). Plánovaná revízia, vertikálna a horizontálna ridge preservation s kostným štepom a augmentáciou autológou drťou TZT z extrahovanej 38. Piezochirurgicky odstránená kortikális krytu 38 (c, d), jej využitie formou kostného štepu. Extrakcia 38 a augmentácia lôžka (e). Preparácia mukoperiostu, exkochléácia, fistulektómia (f), ridge preservation, fixácia štepu (g, h) s krytím (i) resorbovateľnou kolagénovou membránou. RTG po 4 mesiacoch pred implantáciou(j)prezentuje dostavbu denznou kosťou.

**Fig. 5.** A 28-year-old female patient with a chronic fistula in region 11 (a), after repeated resection and extractions of the 11. Vertical and horizontal loss of the alveolar bone (b). Planned revision, vertical and horizontal ridge preservation with bone graft and augmentation with autologous HDT crushed from 38. Piezosurgically removed cortical cover of 38 (c, d), its use as a bone graft. Extraction of 38 and augmentation of the socket (e). Preparation of the mucoperiosteum, exkochlécia, fistulectomy (f), ridge preservation, fixation of the graft (g, h) with a resorbable collagen membrane (i). RTG 4 months before implantation (j) shows bone structure.



(c, d), its use in a form of bone graft. Extraction of the 38 and augmentation of the bed (e). Preparation of the mucoperiosteum, excochleation, fistulectomy (f), ridge preservation, graft fixation (g, h) with covering (i) of resorbable collagen membrane. An RTG done four months later, prior to implantation (j) indicates an additional formation of a dense bone.



**Obr. 6.** 55-ročná pacientka (a). V prvej chirurgickej fáze extrakcia zubov 21, 22, 26 a piatich retinovaných zubov 18, 13, 23, 25, 28, následne uskladnených v mraze. Stav po extrahovaní retinovaných zubov s výraznou stratou kosti (b). 4 mesiace po extrakciách vykonaná vertikálna a horizontálna ridge preservation defektu autológovou drťou TZT, zároveň uzáver perzistujúcej COA po prvej chirurgickej fáze (c, d). Stav 3 mesiace po augmentácii pred plánovanou implantačnou fázou (e). Príklad detailov z CT analýz región 24 a 26 pred a po augmentácii - prítomná dostavba kostného volumu (f, g, h, i). Masívna úroveň novovytvorenej kosti vysokej denzity, charakteru skôr kompakty ako spongiózy (j, k). Aplikované 4 enoseálne implantáty, ktoré vďaka kvalite vytvorenej kosti mali výbornú primárnu stabilitu (l). Protetická fáza - finalizácia kovokeramickým podmieneným snímateľným mostíkom (m).

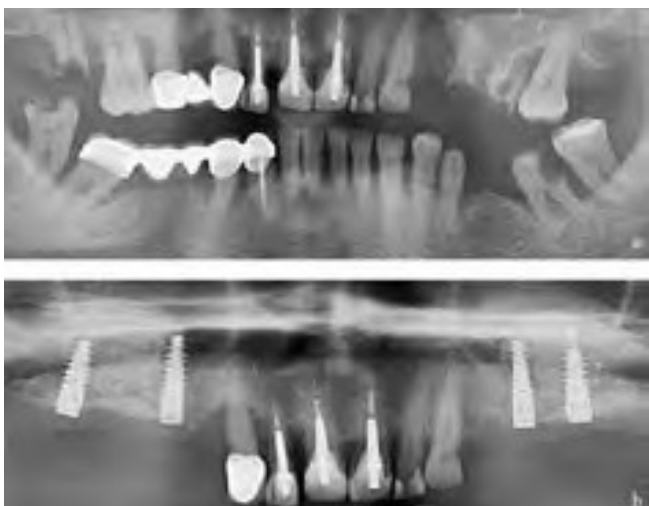
**Fig. 6.** A 55-year-old female patient (a). The first surgical phase of extraction of the teeth 21, 22, 26 and five retained teeth (18, 13, 23, 25, 28), subsequently stored in a freezer. State after extracted retained teeth with significant bone loss (b). Four months after the extractions, the vertical and horizontal ridge preservation of the defect performed by the autologous HDT graft, simultaneously the COA-persistent closure after the first surgical phase (c, d). State three months after

augmentation, prior to the planned implantation phase (e). A CT analysis of regions 24 and 26 before and after augmentation – the augmentation of bone volume present (f, g, h, i). A massive layer of newly formed bone of high density, of a rather compact than sponge character (j, k). Four enoseal implants applied, thanks to augmented bone of good quality with excellent primary stability (l). The prosthetic phase – finalization by means of a ceramometallic removable bridge (m).



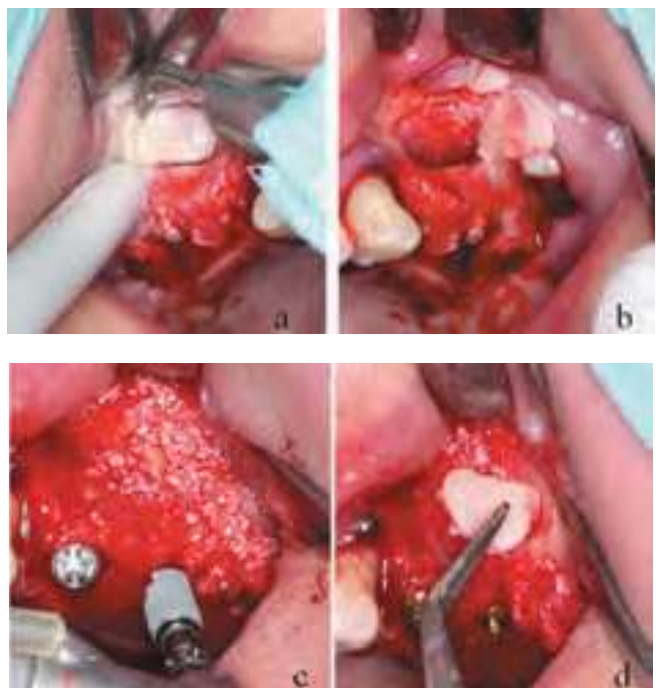
**Obr. 7.** RTG hodnotenie stavu pred začatím protetickej fázy (a) a 36 mesiacov po jej ukončení (b) jednoznačne dokumentuje vytvorenie plnohodnotnej novej kosti a neprítomnosť objemových úbytkov alebo zmien štruktúry novovytvorenej kosti v zmysle poklesu jej denzity.

**Fig. 7.** RTG assessment of the state before the prosthetic phase (a) and 36 months after finishing the prosthetic phase (b) documents formation of a new bone and the absence of bone volume loss or changes in the structure of the newly formed bone in terms of the decrease in its density.



**Obr. 8.** 47-ročná pacientka - terminálne štádium generalizovanej parodontitídy (a). Plánovaná implantácia s využitím augmentácie autológnu drťou TZT z extrahovaných zubov v niekoľkých etapách. 1. fáza - extrakcie zubov horných distálnych zón, sinus lift bilaterálne so 4 zavedenými fixtúrami. 2. fáza – extrakcie zubov dolných distálnych zón, augmentácie a okamžité zavedenie 4 implantátov. 3. fáza - extrakcie zubov horného frontu, augmentácie a okamžité zavedenie 4 implantátov. Vzhľadom na limitované množstvo augmentačného materiálu sme pri sinus lift vpravo použili xenogénny materiál bovinného pôvodu a vľavo autológne TZT(b).

**Fig. 8.** A 47-year-old female patient – with a final stage of generalized periodontitis (a). Planned implantation through augmentation with the ground autologous HDT from the extracted teeth in several phases. Phase 1 – extraction of teeth from upper distal areas, sinus lift bilaterally with four inserted fixtures. Phase 2 – extraction of teeth from lower distal areas, augmentation and immediate implantation of four implants. Phase 3 – extraction of upper frontal teeth, augmentation and immediate implantation of 4 implants. Due to limited amount of augmentation material, we used xenogenic material of bovine origin at the sinus lift on the right side and autologous HDT material on the left side (b).



**Obr. 9.** Sinus lift vľavo /sec. Emtiaz/ s využitím autológneho TZT (a, b, c, d)

**Fig. 9.** Sinus lift on the left side with applied autologous HDT (a, b, c, d)





**Obr. 10.** Okamžité zavedenie implantátov vo frontálnom segmente maxily (a, b) s augmentáciou autologným TZT. Stav po zavedení všetkých plánovaných fixtúr po ukončení protetickej fázy v sánke (c).

**Fig. 10.** Immediate introduction of implants in frontal maxillar segment (a, b) with augmentation by means of autologous HDT material. State after introduction of all planned fixtures after termination of the prosthetic phase in the maxilla.



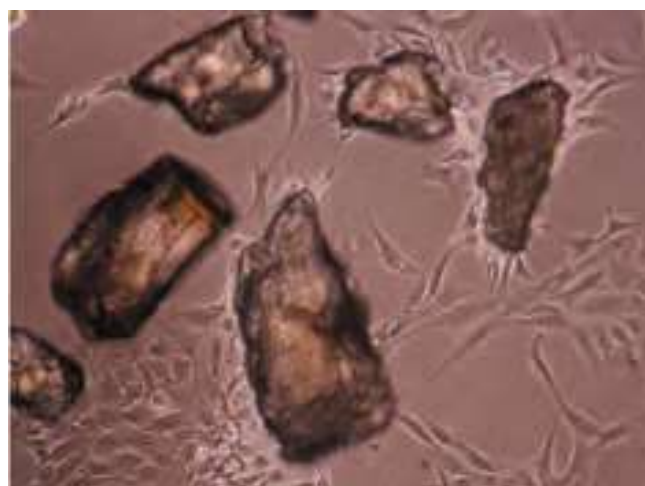
**Obr. 11.** Stav 36 mesiacov po začatí liečby. Diferencie medzi novovytvoreným kostným tkanivom pri sinus lift výkone vpravo a vľavo v závislosti od použitého augmentačného materiálu sme nezaznamenali. Zmeny volumu a denzity kosti po augmentácii autologným TZT neregistrovali.

**Fig. 11.** State 36 months after starting treatment. No differences between the newly created bone tissue at the sinus lift on the right and left side as for the used augmentation material were not noted. Changes in bone volume and density after augmentation with autologous HDT were not registered.

#### Výsledky:

##### Experimentálna časť

1. Porovnanie lokomočnej aktivity buniek MG63 vo výluhu rozomletej drte TZT a v priamom kontakte s drťou TZT.



**Obr. 12.** Bunky línie MG63 po inokulácii s TZT. Zjavná afinita buniek k niektorým zrnám.

**Fig. 12.** Bunky línie MG63 po inokulácii s TZT. Zjavná afinita buniek k niektorým zrnám.

2. Porovnanie špecifickej rastovej rýchlosti buniek vo výluhu rozomletej drte TZT a v priamom kontakte s drťou TZT.

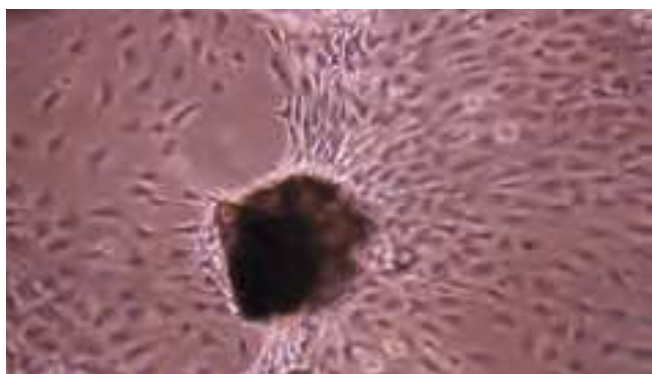




**Obr. 13.** Graf znázorňuje porovnanie špecifickej rastovej rýchlosti buniek MG63 s bežne užívanými materiálmi. Os x zobrazuje jednotlivé vzorky, kde K je referenčná kultúra MG63 bez akéhokoľvek vplyvu, TZT je rozomleté tvrdé zubné tkanivo a vzorky B (Biovan B) a H (Biovan H) ako bežné užívané materiály. Os y ukazuje hodnotu špecifickej rastovej rýchlosti, os z intervaly, ku ktorým sa hodnoty špecifickej rastovej rýchlosti vzťahujú (intervaly stanovené v hodinách). Z výsledkov vyplýva, že bunky obklopené TZT akcelerujú svoju rastovú rýchlosť v prvých 24 hodinách. Pri ostatných materiáloch sa táto akcelerácia presúva do intervalu 48 až 72 hodín. Kontrolná kultúra zvýšenú akceleráciu nevykazuje.

**Fig. 13.** The graph shows a comparison of the specific growth rate of MG63 cells with commonly used materials. Axis x indicates individual samples, where K is the referred culture MG63 free from any influence, HDT is ground hard dental tissue and samples B (Biovan B) and H (Biovan H) as commonly used materials. The axis y indicates the value of the specific growth rate, axis z indicates intervals to which the specific growth rate values are related (intervals determined in hours). The results show that cells surrounded by HDT accelerate their growth rate in the first 24 hours. In other materials, this acceleration is shifted into the interval of 48 up to 72 hours. The control culture does not show any increased acceleration.

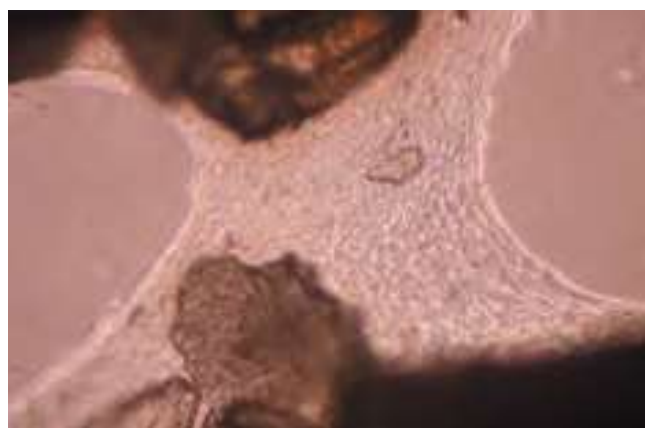
### 3. Dôkaz sústredenia buniek v okolí niektorých zrn drte



**Obr. 14.** Snímka zachycujúca zrná TZT, ktoré na seba sústreďujú bunky MG63. Tieto migrujú k zrnú a sústreďujú sa na jeho povrchu. Túto vlastnosť vykazuje veľká časť zrn v kultúre. Migračná rýchlosť buniek k zrnú zodpovedá približne 60um/hod.

**Fig. 14.** The image captures the HDT grains that attract MG63 cells. These cells migrate to the grain and collect on its surface. This property is displayed by a large proportion of grains in the culture. The migration speed of the cells towards the grains is approximately 60um/hrs.

### 4. Mostíky bunkového tkaniva (pseudotkaniva?) medzi zrnami drte



**Obr. 15.** Do troch až piatich dní sa medzi zrnami TZT tvoria bunkové mostíky (MG63) vytvárajúce organizovanú vrstvu buniek

**Fig. 15.** In three to five days, between the HDT grains, cellular bridges (MG63) are formed to build up an organized layer of cells

### Klinická časť

Krátka doba prípravy materiálu a komfortnosť spracovania dovoľovali vo väčšine indikovaných prípadov preferovanie tejto metodiky voči iným augmentačným materiálom. Po rozomletí sme získavali prakticky 2-násobný objem augmentačného materiálu oproti nespracovanému zubu, čo poväčšine postačovalo pri chirurgických extrakciách retinovaných zubov či soccet preservation iných indikácií. Pri ridge preservation a sinus lift sme v mnohých prípadoch zhotovovali zmes s xenogénnym augmentačným materiálom bovinného typu /Geistlich Bio-Oss®/, rozdiely v klinických pooperačných prejavoch, časový interval tvorby novej kosti, objemové úbytky v sledovanom období po ukončení liečby sme nezaznamenali. Novovytvorená kosť pri použití len samotnej autológnej drte TZT oproti drti v zmesi s xenogénom javila vyššiu denzitu a mala lepšie mechanické vlastnosti a dovoľovala tak pri plánovaných implantáciách skrátenie hojacej periódy na 3 mesiace. Využitie PRP a PRF zlepšovalo nielen

peroperačnú manipuláciu s materiálom, ktorý je konzistentný a ľahko aplikovateľný, ale aj proces hojenia. Preto výskyt komplikácií nepresiahol úroveň bežnú pre tento typ chirurgických zákrokov. Komplikácie v zmysle purulentného výtoku, dehiscencie slizničnej rany, opuchu, pooperačného hematómu a subfebrilie boli v 12 prípadoch. Pri hojení per secundam intentionem, s ktorými sme sa občas stretli, zvyčajne spôsobovaným zvýšeným napätím slizničného krytu, sme obvykle stav len kontrolovali, prípadne vyplachovali 5 % roztokom Metronidazolu. Ani v jednom prípade nebolo nutné odstránenie augmentátu. Pri uvoľňovaní augmentačného materiálu z rany sme ranu zaistovali sekundárnou sutúrou. Augmentačné lokality boli opakované v 6-týždňových intervaloch hodnotené pomocou RTG. Priemerná doba organizácie augmentátu na kosť bola 3 mesiace. V prípadoch následnej implantačnej liečby boli pred implantáciou zhotovené CT skeny. V lokalizáciách plánovaných pre následnú implantáciu boli aplikované enoseálne implantáty, pričom fixtúry po zavedení vykazovali výbornú úroveň primárnej stability. Pri ridge preservation sme časovú etapu do druhej operačnej - implantačnej fázy posúvali na obdobie 6 mesiacov. Protetické zaťaženie po sinus lift výkonoch sme vykonávali po 9 mesiacoch. Pri chirurgickom odkrytí novovytvorenej kosti bolo pravidelným nálezom kvalitné kostné tkanivo skôr charakteru kompaktnej kosti s veľmi dobrými mechanickými vlastnosťami vhodnými pre implantáciu. Oblasti, kde bola vykonaná len augmentácia, bez plánovania ďalších výkonov, preukazovali pri rtg kontrole po 3-mesačnej etape doplnenie plnohodnotnou kosťou. Po ukončení liečby pacienti v rámci recall boli pravidelne RTG hodnotení. Neboli ani v jednom prípade zaznamenané významné objemové straty, sekvestrácie či zlyhania implantátu z dôvodu insuficiencie novovytvoreného kostného svalku. Je vhodné však zdôrazniť potrebu precízneho odstránenia zvyškov paradontálnych tkanív z alveolu pri socket preservation, kedy pri nedostatočnej excochleácii eventuálne ofrízovaní stien alveolu môže sa v rámci hojenia a tvorby novomaturovanej kosti vytvoriť väzivová medzivrstva medzi kosťou a stenou alveolu a celý novovytvorený blok kosti môže byť pri implantácii dislokovaný. Podobne pri ridge preservation odporúčame viacnásobné perforácie kompakty za účelom lepšieho prerastenia podkladu a novovytvorenej kosti.

### Diskusia

Využitie dentínu, resp. TZT alebo ich jednotlivých súčastí, v riadenej regenerácii kosti nie je idea nová. Osteoindukčný potenciál dentínu

bol prezentovaný už v roku 1967 a odvtedy sa tejto problematike venuje mnoho autorov [27]. Vzhľadom na fakt, že mnohé komponenty alveolárnej kosti a zubných tkanív majú identický ontogenetický základ, je logické, že TZT tak môžu veľmi úspešne slúžiť ako kostný transplantát v rámci kompenzácie objemových hendikepov alveolárnych kostí [6, 7]. Nielen minerálne zložky, no hlavne organické komponenty v tomto procese zohrávajú mimoriadne dôležitú úlohu. Jednotlivé metodiky využívajúce buď NCPs extrahovaný z dentínu, alebo dentinové partikuly (tooth ash), mrazom sušený dentín, demineralizovaný či denaturovaný dentín, zohrávajú v tejto problematike významný prínos. Lyofilizácia, aplikácia tekutého dusíka, sú častými metódami znižujúcimi antigénnu odpoveď príjemcov. Zvlášť prínosný je preukázaný potenciál NCPs na osteogenéze, ktorý je tak hodnotený ako optimálna alternatíva kostného štepu.

Organická zložka dentínu je resorbovateľný materiál s prítomnosťou progenitorových buniek, zložiek matrix a GF a mnohých iných komponent majúcich pozitívny osteoindukčný a osteokondukčný efekt [21], ktorých uvoľňovanie umocňuje demineralizácia dentínu. DDM – demineralizovaná dentinová matrix, napomáha prerastaniu novovytvorenej kosti [12]. Štúdie sledujúce efekt denaturovaného dentínu charakteru HA a TCP konštatujú prínos pre osteogenézu, zvlášť pri spojení s PRP, pri súčasnom vylúčení možnosti antigénnej odozvy.

Finálne produkty využívané pri augmentačných postupoch sú vo forme blokov, lamiel, dentinovej drte, prachu, popola, sedimentu, granúl, membrán a podobne. Častá býva práve drť, ktorej veľkosti partikul 300 – 1200 µm zohráva podstatnú rolu z pohľadu osteoinduktivity a osteokonduktivity. Naše experimentálne pozorovania in vitro potvrdili, že pri zrnách menších rozmerov ako 300 µm dochádza viac k fagocytóze a nedochádza tak k ich zakomponovaniu do novovytvorenej kosti.

Prevažná väčšina uvádzaných metód, využívajúcich len samotný dentín či jeho niektoré komponenty, sú náročné z pohľadu postupu, časovej a ekonomickej náročnosti. Tak sa stávajú pre prax málo atraktívnou alternatívou voči xenogénnym augmentačným materiálom. Samozrejme, autológny kostný štep, ako optimálna alternatíva kostného graftu, je stále z pohľadu osteogenézy zlatým štandardom, často je však spojený s nedostatočnou ponukou možnosti z miesta odberu, z hľadiska objemu, pričom vyžaduje ďalší operačný výkon. Princíp využitia naturálneho autológneho



granulátu TZT zahrňuje z tohto hľadiska viacero pozitív. Spracovanie naturálneho TZT má jednoduchý protokol, časovo nenáročný, cca 20 minút, finančne prístupný. Bakteriálne testy partikul TZT po chemickej dezinfekcii preukázateľne potvrdzujú neprítomnosť bakteriálneho rastu /výskyt 5 – 10 CFU (colony forming units) po dezinfekcii stanovenej protokolom/ [2]. NaOH a alkohol napomáhajú lyofilizácii, denaturalizácii, demineralizácii, odmasteniu, deproteinizácii z tubulov a odstráneniu detritu a baktérií. Dostatočnosť a profit chemickej sterilizácie v porovnaní so sterilizáciou v autokláve, po ktorej signifikantne klesá osteogenná aktivita dentínu, potvrdzujú viaceré štúdie [13]. Histologické štúdie potvrdzujú, že autológna drť, zvlášť pri použití čerstvých alebo zmrazených TZT, má významný osteoidukčný efekt. Na histogramoch bola potvrdená novotvorba kosti a ciev okolo korpuskúl dentínu [14]. Neevokuje žiadnu imunitnú odpoveď. Partikuly dentínu majú vysokú osteokondukčnú schopnosť, nepodliehajú resorbcii, sú postupne obalované novomaturovanou kosťou, prítomné dentinové tubuly otvorené dezinfekciou ešte zlepšujú prepojenie a prerastanie s kosťou. Dochádza k ankylotickému spojeniu kosti a partikul. Sklovina, ktorá je súčasťou drte, síce nejaví žiadny osteogénny efekt, avšak taktiež sa ankyloticky spája s kosťou, čo umocňuje denzitu, vyššiu ako pri použití xenogénov. Ankylotické spojenia kosti a drte TZT tak zlepšujú jej mechanické vlastnosti, viac podobné kortikalis, a tak umožňujú skoré pokračovanie v implantačnej liečbe. Vďaka prítomnosti matrix partikul TZT a kosti nedochádza prakticky k resorbcii. Experimentálna časť našej práce potvrdila, že TZT upravené rozomletím vykazujú miernu heterogenitu medzi jednotlivými zrnami. Väčšina zrn pôsobí na bunky stimulačne v zmysle migrácie a náhodná lokomócia buniek sa mení na chemotaktickú. Bežná rýchlosť buniek sa zvyšuje priemerne na dvojnásobok v smere k aktívnym zrnám. Menšia časť zrn túto vlastnosť nevykazuje. Predpokladáme, že tento stimulačný efekt migrácie je potencovaný komponentmi dentinovej organickej matrix. Je teda zrejmé, že následným krokom bude preukázanie stimulačného efektu a jeho využitie. Tento predpoklad je však nutné overiť ďalšími experimentmi. Histologické štúdie sledujúce vlastnosti autológnej drte TZT v zmesi s inými xenogénnymi materiálmi nepotvrdili negatíva takejto indikácie [5]. Využitie PRP v protokole augmentácie konštatuje jej prínos v zmysle proteosyntézy, neovaskularizácie, redukcie zápalovej fázy, kolagenézy, fibrogenézy a osteogenézy [9, 18].

## Záver

Experimentálne a klinické výsledky potvrdzujú opodstatnenosť využitia autológnej drte TZT. Konštatujeme vlastnosti materiálu, ktoré môžeme zhrnúť :

- prítomnosť čerstvého, resp. mrazom uchovávaného dentínu v drti TZT zabezpečuje osteogénnu aktivitu jeho organickými komponentmi,
- zrná TZT pôsobia stimulačne na migráciu buniek heteroploidnej línie MG63, ktoré medzi nimi vytvárajú organizované bunkové premostenia v experimentálnych podmienkach,
- pri novotvorbe kosti dochádza k ankylotickému spojeniu drte s kosťou zvyšujúcemu denzitu,
- minerálne zloženie TZT je chemicky a štruktúrne podobné kosti,
- rýchlejšia dostavba a remodelácia kosti urýchľuje chirurgický protokol,
- ankylotická matrica dentin - kosť vykazujúca malú resorbciu štepu,
- materiál preukazuje vhodné vlastnosti pri spojení s inými augmentačnými materiálmi.

Tieto vlastnosti umožňujú všestranné využitie autológnej drte TZT v implantológii, stomatochirurgii, parodontológii v rámci procesov riadenej kostnej regenerácie.

## Literatúra

1. AMBROSE, E. J.: The use of interference microscope for the study of cell movements and quantitative analysis of changes in growing cells. In Rose.G.ed.: Cinemicrography in cell biology pp 123 – 142.
2. BINDERMAN, I., HALLEL, G., NARDY, G., YAFFE, A., SAPOZNIKOV, L. A.: Novel procedure to process extracted teeth for immediate grafting of autogenous dentin. J Interdiscipl Med Dent Sci 2014, 2: 6.
3. BUTLER, W. T., RITCHIE, H.: The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. Int J Dev Biol 1995; 39 (1): 169 – 179.
4. BUTLER, W. T., BRUNN, J. C., QIN, C.: Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. Connect Tissue Res 2003; 44 (1): 171 – 178.
5. CARINI, F., LONGONI, S., AMOSSO, E., PALEARI, J., CARINI, S., PORCARO, G.: Bone augmentation with Ti-Mesh. autologous bone versus autologous bone and bone substitutes. A systematic review. Annali di Stomatologia. 2014; 5 (No 2 Suppl to No 2): 27 – 36.
6. DONOVAN, M. G., DICKERSON, N. C., HELLSTEIN, J. W., HANSON, L. J.: Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine. J Oral Maxillofac Surg 1993, 51: 898 – 903.
7. D'SOUZA, R. N., CAVENDER, A., DICKINSON, D., ROBERTS, A., LETTERIO, J.: TGF  $\beta$ 1 is essential for the homeostasis of the dentin pulp complex. Eur J Oral Sci 1998; 106 (S1): 185 – 191.
8. ELKAYAR, A., ELSHAZLY, Y., ASSAAD, M.: Properties of hydroxyapatite from bovine teeth. Bone Tissue Regen Insights 2009; 2: 31 – 36.

9. FREI, R., BIOSCA, F. E., HANDL, M., TRČ, T.: The role of growth factors in the human organism and their use in medicine, especially in orthopedics and traumatology. *Acta Chir. orthop. Traum. Čech.*, 75: 247 – 252, 2008.
10. GOLDBERG, M., SMITH, A. J.: Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15 (1): 13 – 27.
11. HUGGINS, C., WISEMAN, S., REDDI, A. H.: Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. *J Exp Med* 1970; 132: 1250 – 1258.
12. HYO-J. L., JI-S. H., YOUNG-K. K., IN-W. U., JAE-I. L.: Osteogenic Potential of Demineralized Dentin Matrix as Bone Graft Material, *J. Hard Tissue Biology* Vol. 26 (2): 223 – 230, 2017.
13. JIN, S. V., KIM, S. G., OH, J. S., LIM, S. C., JEONG, M. A., KIM, J. S.: Histomorphometric Analysis of Contaminated autogenous Tooth Graft Materials After Various Sterilization. *Implant Dentistry*, 25 (1): 83 – 89, FEB 2016.
14. KADKHODAZADEH, M., GHASEMIANPOUR, M., SOLTANIAN, N., SULTANIAN, G. R., AHMADPOUR, S., AMID, R.: Effects of fresh mineralized dentin and cementum on socket healing: a preliminary study in dogs. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2015; 41 (3): 119 – 123.
15. KIM, S.G., KIM, Y.K., LIM, S.C., KIM, K.W., UM, I.W.: Histomorphometric analysis of bone graft using autogenous tooth bone graft. *Implantology* 15, 2011: 134 – 141.
16. KIM, Y.K.: Bone graft material using teeth. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2012, 38: 134 – 138.
17. KIM, Y.K., KIM, S.G., OH, J.S., JIN, S.C., SON, J.S., KIM, S.Y. et al.: Analysis of the inorganic component of autogenous tooth bone graft material. *J Nanosci Nanotechnol* 2011; 11: 7442 – 7445.
18. KUČERA, J., ŠMÁLIK, L., GAJDOŠOVÁ, Z.: Klinické hodnotenie prínosu rastových faktorov aplikovaných metódou PRP a PRF v reparatívnych a regeneratívnych procesoch u implantačne ošetrených pacientov. *Stomatológ*, XXIV, 2014, 1, s. 35 – 41.
19. MARTIN-DE LAS HERAS, S., VALENZUELA, A., OVERRALL, C. M.: The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000; 45 (9): 757 – 765.
20. MAZZONI, A., BRESCHI, L., CARRILHO, M., NASCIMENTO, F. D., ORSINI, G. JR A. R. et al.: A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. 2012 (1): 19 – 40.
21. ORSINI, G. JR A. R., MAZZONI, A., NATO, F., MANZOLI, L., PUTIGNANO, A. et al.: A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part 1: proteoglycans and glycoproteins. *Endod Topics* 2012; 21 (3): 1 – 18.
22. QIN, C., BRUNN, J.C., CADENA, E., RIDALL, A., TSUJIGIWA, H. et al.: The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 2002, 81: 392 – 394.
23. SLAPNICKA, J., FASSMANN, A., STRASAK, L., AUGUSTIN, P., VANEK, J.: Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. *J Oral Maxillofac Surg*, 2008 Feb; 66 (2): 297 – 301.
24. TABATABAEI, F. S. et al.: A review on implications of tissue engineering in different fields of dentistry. *J Dent Med* 2012; 25 (1): 6 – 13.
25. TABATABAEI, F.S., TATARI, S., SAMADI, R., MOHARAMZADEH, K.: Different methods of dentin processing for application in bone tissue engineering: A systematic review. *J. Biomedical Mat. Res. Part A*, 2016, 104: 10, 2616 – 2627.
26. TOMSON, P. L., GROVER, L. M., LUMLEY, P. J., SLOAN, A. J., SMITH, A. J., COOPER, P. R.: Dissolution of bioactive dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 2007; 35 (8): 636 – 642.
27. YEOMANS, J. D., URIST, M. R.: Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. *Arch Oral Biol* 1967; 12: 999 – 1008.
28. YU-CH, H., WEI-Z, L., SHENG-W, F., WEI-L, YOSHIMITSU, A., HAW-M, H.: Histomorphometric and transcriptome evaluation of early healing bone treated with a novel human particulate dentin powder. *Biomedical Materials* 2017, 12: 1, 015004.

**MUDr. Ján Kučera, PhD.**  
**STONEK s. r. o.**  
**Krivá 23**  
**040 01 Košice**