

ANDRZEJ WOJTOWICZ^{1, A-E}, JAN PEREK^{1, A, B, D}, ELŻBIETA URBANOWSKA^{2, A-D},
ARTUR KAMIŃSKI^{3, A-D}, EWA OLENDER^{3, A-D}, MONIKA JODKO^{1, E, F}

Leczenie defektów tkanki kostnej szczęk z wykorzystaniem autologicznych preosteoblastów na nośniku allogenicznym*

The Treatment of Maxillary Bone Defects Used Autologic Pre-Osteoblasts on Allogenic Bone Scaffolds

¹ Zakład Chirurgii Stomatologicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

² Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

³ Zakład Transplantologii i Centralny Bank Tkanek Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

A – koncepcja i projekt badania; B – gromadzenie i/lub zestawianie danych; C – opracowanie statystyczne;
D – interpretacja danych; E – przygotowanie tekstu; F – zebranie piśmiennictwa

Streszczenie

Wprowadzenie. Metody regeneracji kości stały się istotnym elementem współczesnej implantologii, a niedostateczna ilość tej tkanki ogranicza, a nawet uniemożliwia przeprowadzenie leczenia implantologicznego. Rozwiązaniem w tych przypadkach jest zastosowanie zabiegów sterowanej regeneracji kości lub też wykorzystanie rekombinowanych czynników wzrostowych. W Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej WUM w zaawansowanych przypadkach defektów kostnych oraz w przypadkach niedostatecznej szerokości wyrostka zębodołowego przed zaplanowaną implantacją wdrożono wykonywanie nowatorskich metod augmentacji tkanki kostnej z wykorzystaniem autogenicznych, hodowanych *in vitro* preosteoblastów na nośniku w postaci allogenicznych bloków kostnych.

Cel pracy. Ocena regeneracji tkanki kostnej szczęk po zastosowaniu przeszczepów allogenicznych bloków kostnych zasiedlonych populacją autogenicznych preosteoblastów hodowanych *in vitro*.

Materiał i metody. Na przykładzie 2 pionierskich przypadków klinicznych zaprezentowano nowatorską metodę leczenia defektów kostnych szczęk stosowaną w Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej WUM. Badaniem objęto pacjentów zakwalifikowanych do leczenia przedprotetycznego ubytków tkanki kostnej. Po przeprowadzeniu wielu badań kwalifikujących i przy braku przeciwwskazań do przeprowadzenia zabiegu wyselekcjonowanych pacjentów skierowano do pobrania szpiku, z którego wyizolowano komórki macierzyste. Docelowa hodowla była ukierunkowana na linię komórek osteogenicznych – preosteoblastów. W Centralnym Banku Tkanek WUM przygotowano allogeniczne bloki kostne, które następnie *ex tempore* zasiedlano populacją hodowanych *in vitro* preosteoblastów. Tak przygotowane przeszczepy, bioreaktorem umiejscawiano w miejscu defektów kostnych za pomocą śrub lub minipłytek do osteosyntezy.

Wyniki. Klinicznie stwierdzono znakomite gojenie się ran, widocznie przyspieszone w stosunku do podobnych zabiegów bez wykorzystania wszczepianych komórek lub czynników stymulujących gojenie się ran i regenerację tkanek. Obrazy radiologiczne analizowane po 16–17 tygodniach od wszczepienia wykazały przebudowę przeszczepów, ich inkorporację w łożo kostne oraz pojawienie się wczesnych ognisk mineralizacji na bazie istniejącego rusztowania.

Wnioski. Metody augmentacji tkanki kostnej z wykorzystaniem omówionej techniki mogą okazać się istotne w leczeniu zaawansowanych przypadków defektów kostnych różnego pochodzenia oraz mogą być alternatywą przeszczepienia kości autogenicznej w celach regeneracyjnych (*Dent. Med. Probl.* 2013, 50, 1, 20–29).

Słowa kluczowe: augmentacja kości u ludzi, przeszczep kostny, regeneracja kości, komórki macierzyste.

Abstract

Background. Bone regeneration methods have become an essential part of modern implantology, and insufficient bone quantity limits, or even makes impossible to carry out implant treatment. The solution in these cases is the use of guided bone regeneration or the use of recombinant growth factors. In Department of Dental Surgery, Medical

* Źródła finansowania: 1S113/3F48R/2012, projekt NCBIR, WUM 3F48S.

University of Warsaw in advanced cases of bone defects and in cases of insufficient width of the alveolar ridge before the planned implantation innovative methods of bone augmentation using autogenous, cultured *in vitro* preosteoblasts on the scaffolds in the form of allogeneic bone blocks were implemented.

Objectives. Assessment of jaw bone regeneration after the application of bone allografts colonized by autogenous, cultured *in vitro* preosteoblasts population.

Material and Methods. On the example of two pioneering clinical cases a novel method for treating bone defects of the jaws used in the Department of Oral Surgery, Medical University of Warsaw was presented. The study included patients qualified for pre-prosthetic treatment of bone defects. After conducting a series of qualifying studies and lack of contraindications to perform the procedure selected patients referred to marrow harvesting, from which the stem cells were isolated. Targeted culture was oriented on osteogenic cells line – preosteoblasts. In the Central Bank of Tissues MUW allogeneic bone blocks were prepared and inhabited *ex tempore* by cultured *in vitro* preosteoblasts population. Thus prepared grafts were placed by bioreactor at the site of bone defects using screws or miniplates for osteosynthesis.

Results. Clinically, excellent wound healing were observed, apparently accelerated compared to similar treatments without the use of implanted cells or factors stimulating wound healing or tissue regeneration. Radiographic images analyzed after 16–17 weeks after implantation showed grafts remodeling, their incorporation in the bone bed, and the appearance of the early lesions of mineralization on the basis of existing scaffold.

Conclusions. Bone augmentation methods using discussed technique may become crucial in the treatment of advanced cases of bone defects of various origins and may constitute an alternative to autogenous bone transplantation for regeneration purposes (**Dent. Med. Probl.** 2013, 50, 1, 20–29).

Key words: human bone augmentation, bone allograft, bone regeneration, stem cells.

Metody regeneracji kości stały się najważniejszym przedmiotem badań współczesnej implantologii [1]. Niedostateczna ilość tkanki kostnej powstała na skutek zmian zanikowych, urazów, zmian patologicznych oraz w wyniku chorób ogólnoustrojowych niejednokrotnie ogranicza możliwości przeprowadzenia leczenia implantoprotetycznego [2, 3]. W wielu przypadkach jedynym rozwiązaniem jest wykonanie zabiegu sterowanej regeneracji kości (GBR) lub też wykorzystanie rekombinowanych czynników wzrostowych [4]. Metody stosowane w technikach regeneracyjnych stale się zmieniają [5–13]. Celem poszukiwania nowych rozwiązań jest uzyskanie odpowiednich warunków kostnych niezbędnych do przeprowadzenia leczenia implantologicznego. Kompleksowa rehabilitacja implantoprotetyczna ma na celu przywrócenie czynności żucia, artykulacyjnych, a także walorów estetycznych nieodłącznie związanych ze sferą psychologiczną pacjenta.

Mimo iż obecnie obserwuje się dynamiczny postęp w obrębie metod i materiałów używanych w zabiegach augmentacji kości, to do prawidłowego i wydajnego przebiegu procesu regeneracji tkanki kostnej są potrzebne 3 składowe, tzw. triada Lyncha [14]. Pierwszy element stanowi nośnik (rusztowanie), którym może być materiał kostny pochodzenia autogenego lub obcego, materiał syntetyczny (resorbowalny lub nieresorbowalny), a także żel [14]. Drugi element to cząsteczki sygnałowe procesu gojenia, którymi mogą być białka morfogenetyczne kości (BMPs), adhezyny, hormony, witaminy oraz czynniki wzrostu (PDGF, TGF i in.), miejscowe lub egzogenne [14]. Trzecią składową są komórki, na które wpływają ww. czynniki wzrostu. Są to komórki niezróżni-

cowane: macierzyste (*stem cells*), komórki częściowo zdeterminowane (np. preosteoblasty, fibroblasty) oraz komórki zróżnicowane (np. fibrocyty, osteocyty). Źródłem tych komórek może być szpik, okostna, tkanka kostna, rzadziej krew; mogą być one izolowane lub też po izolacji namnażane *in vitro* przed wszczepieniem w miejsce defektu kostnego. Wcześniejsze badania kliniczne wykazały brak efektu terapeutycznego korzystniejszego w porównaniu z innymi metodami po zastosowaniu izolowanych ze szpiku komórek macierzystych CD34+ w liczbie 1–2 mln/przeszczep na nośniku ksenogennym w postaci granulatu w celu wypełnienia jam kostnych po cystektomiach.

W Zakładzie Chirurgii Stomatologicznej WUM w zaawansowanych przypadkach ubytków kostnych oraz w przypadkach niedostatecznej szerokości wyrostka zębodołowego przed zaplanowaną implantacją wdrożono wykonywanie nowatorskich zabiegów augmentacji tkanki kostnej z wykorzystaniem autogenych preosteoblastów hodowanych *in vitro* z komórek macierzystych, izolowanych ze szpiku, na nośniku allogenicznym bloku kostnym (Centralnego Banku Tkanek). Podczas przeprowadzanej w specjalnych warunkach indukcji wzrostu komórek macierzystych dochodzi do zwiększenia ich liczby do 30–40 milionów. Docelowa hodowla jest ukierunkowana na linię komórek osteogennych – preosteoblastów. Poniżej przedstawiono 2 pionierskie przypadki kliniczne ilustrujące zastosowanie omówionej metody.

Celem pracy była wczesna ocena regeneracji tkanki kostnej szczęk po zastosowaniu augmentacji tkanki kostnej z wykorzystaniem hodowanych *in vitro* autogenych preosteoblastów na nośnikach allogenicznych bloków kostnych.

Material i metody

Pacjentów wyselekcjonowano na podstawie kryteriów włączenia i wyłączenia zgodnie z protokołem. W pierwszym etapie klinicznie oceniano stan jamy ustnej, pod kątem potrzeb implantoprotetycznych, szczególnie konieczności zastosowania leczenia przedprotetycznego defektów kostnych. Następnie wykonywano projekcję CBCT w celu ustalenia szczegółów doboru wielkości i kształtu przeszczepu/allogenicznego bloku kostnego. Po wstępnym zakwalifikowaniu pacjentów informowano o szczegółach projektu ustnie i na piśmie (Informacja dla pacjenta). Następnie u pacjentów wstępnie wyselekcjonowanych wykonano badania kwalifikujące do dalszej procedury pobrania szpiku, izolacji i hodowli komórek macierzystych/preosteoblastów: przeciwciała anti-HIV1/HIV2, anti-HBc, anti-HBc (klasy IgM), test kiłowy (WR), odczyny kiłowe (np. TPFA), morfologię z rozmazem, OB, CRP.

Po uzyskaniu negatywnych wyników badań kwalifikujących, świadczących o dobrym zdrowiu i braku przeciwwskazań do wykonania planowanego leczenia, a także braku potencjalnych

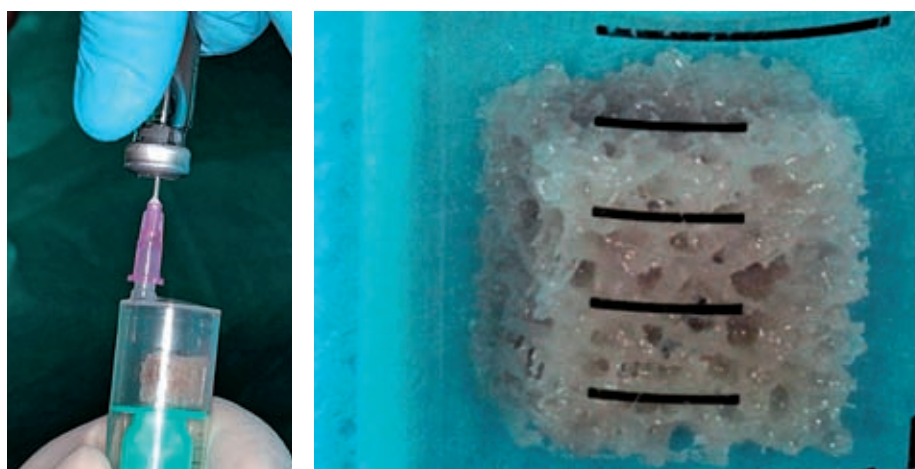
czynników zakaźnych pacjentów skierowano do pobrania szpiku, izolacji komórek macierzystych CD 34+ oraz ich dopuszczeniu do hodowli *in vitro*. Pobranie szpiku odbyło się w Banku Komórek Macierzystych WUM na drodze trepanobiopsji aspiracyjnej z talerza kości biodrowej. Pobrany szpik został przekazany w celu izolacji komórek macierzystych (Nr pozwolenia IMPOMED: AEZ/365/S-110/439/2012) (ryc. 1).

Bloki kostne allogeniczne były przygotowywane w standardowy sposób, dobierane do kształtu i wielkości defektu kostnego oraz dodatkowo dopasowywane kształtem podczas zabiegu z wykorzystaniem pił rotacyjnych i piezoelektrycznych. Selekcję dawców oraz procedurę przygotowania allogenicznych bloków tkanki kostnej gąbczastej przeprowadzono w Centralnym Banku Tkanki WUM w Warszawie. Bloki kostne były przechowywane w temperaturze -70°C , odmrażane przed zabiegiem chirurgicznym oraz zasiedlane komórkami macierzystymi/preosteoblastami *ex tempore* w strzykawce z ujemnym ciśnieniem pozwalającym na zassanie komórek w głąb przeszczepu kostnego (ryc. 2).



Ryc. 1. Fiolki z preosteoblastami, zdjęcie prawe: preosteoblasty w dolnej części stożka fiolki, w górnej części supernatant hodowli

Fig. 1. Vials contains preosteoblasts (right picture), preosteoblasts are visible in the bottom of vials, in upper part – incubational supernatant



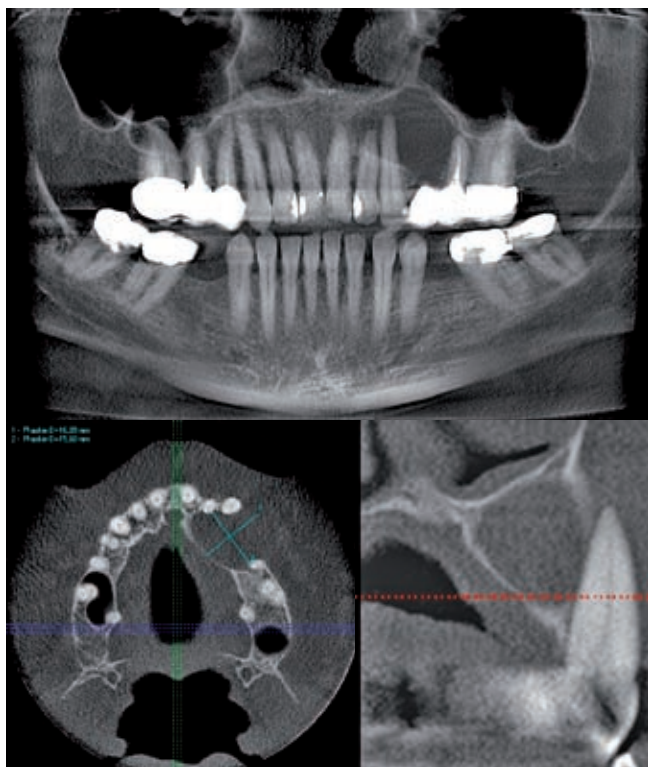
Ryc. 2. Preosteoblasty aspirowane podciśnieniowo do strzykawki zawierającej allogeniczny bloczek kostny w celu penetracji komórek w głąb bloku nośnika

Fig. 2. Aspiration of pre-osteoblasts into the syringe contains allogenic bone block. Under-pressure was applied for deeper cells penetration into the scaffold

Pacjent 1

54-letnia kobieta zgłosiła się do Zakładu Chirurgii Stomatologicznej w celu leczenia torbieni korzeniowej w okolicy zębów 22–25. Diagnostykę radiologiczną wykonano z użyciem tomografii stożkowej CBCT (Gendex). Na obrazie tomograficznym stwierdzono ubytek osteolityczny o wymiarach $16,09 \times 15,6 \times 15,51$ mm obejmujący korzenie zębów 22–25 (ryc. 3). Zaplanowano i przeprowadzono zabieg chirurgicznego wyluszczenia torbieni z jednoczasową augmentacją tkanki kostnej z wykorzystaniem allogenicznego przeszczepu bloku kostnego (pochodzącego z Centralnego Banku Tkanek) zasiedlonego populacją hodowanych *in vitro* autologicznych preosteoblastów. W tym celu pacjentka została skierowana do Centralnego Szpitala Klinicznego w celu pobrania szpiku kostnego, z którego następnie wyizolowano komórki macierzyste. W wyniku indukcji wzrostu osiągnięto liczbę 35 mln komórek

– presosteoblastów. Przeprowadzono leczenie endodontyczne zębów 22 i 25. W znieczuleniu nasiękowym 2% lidokainą nacięto i odwarstwiono płat śluzówkowo-okostnowy w okolicy zębów 22–25 (ryc. 4). Ząb 23 zakwalifikowano do ekstrakcji. Torbiel korzeniową wyluszczone, ubytek kostny wyłuszczone oraz wygładzone brzegi kostne. Jamę kostną wypełniono dopasowanym uprzednio allogenicznym bloczkiem kostnym pokrytym i infiltrowanym komórkami macierzystymi/preosteoblastami i ustabilizowano za pomocą mini płytki do osteosyntezy (Medartis®) (ryc. 4). Ranę zaopatrzono szwami. Założono uzupełnienie tymczasowe odbudowujące brak zęba 23 (ryc. 5). Zastosowano chłodzenie pozabiegowe emitowane przez urządzenie Hilotherm przez 30 min. Pacjentka przyjmowała Augmentin 0,625 (2 × 1), metronidazol 0,25 (3 × 1). Szwy usunięto po 7 dniach. Następnie wykonano kontrolne badanie CBCT (po 17 tygodniach od zabiegu), na którym uwidoczniło się położenie przeszczepu (ryc. 6).



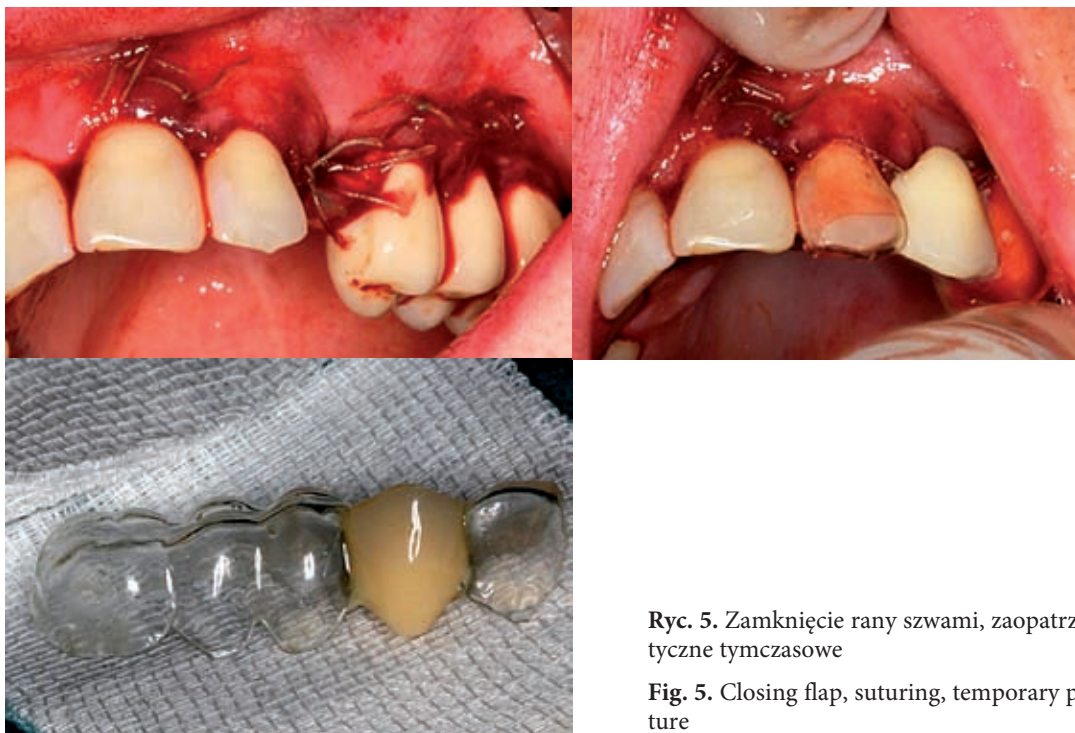
Ryc. 3. CBCT w planowaniu, panorex – widoczna torbiel okolicy 22–25, skan horyzontalny, widoczna torbiel rozprzestrzeniająca się od przedsionka (całkowicie zniszczona blaszka przedsionkowa) aż do blaszki zbitęj podniebienia. Ząb 22 pozbawiony podparcia kostnego w kontakcie ze ścianą torbieni

Fig. 3. CBCT in planning, panorex – cysts 22-25 in vestibular side, no facial bone, horizontal scan: palatal cortical bone complete, tooth 22 without bone support, contact with cyst



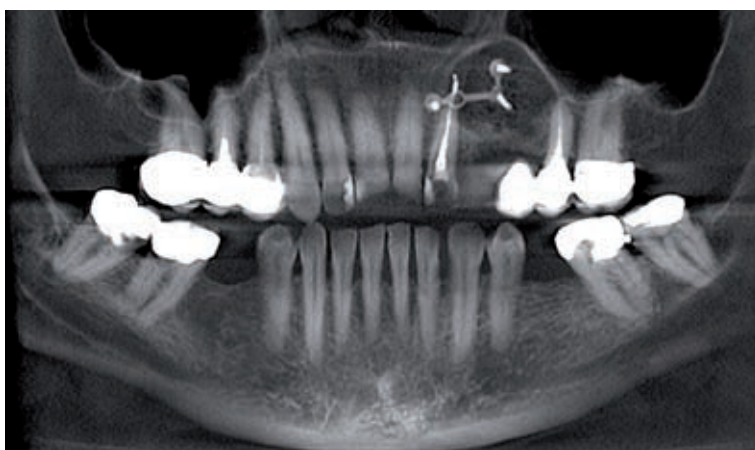
Ryc. 4. Odślonienie płata okostna–błona śluzowa, instalacja przeszczepu preosteoblastów hodowanych *in vitro* na nośniku – bloku allogenicznym, stabilizacja przeszczepu mini płytkami do osteosyntezy (Medartis)

Fig. 4. Opening mucosal-periosteal flap, transplantation of allogenic bone block scaffold with autogenic preosteoblasts cultured *in vitro*; miniplate (Medartis) was used for stabilization of the graft



Ryc. 5. Zamknięcie rany szwami, zaopatrzenie protezyczne tymczasowe

Fig. 5. Closing flap, suturing, temporary partial denture



Ryc. 6. Kontrolne opg (2 tyg. po zabiegu). Widoczny przeszczep stabilizowany miniplatkami, kontrolne CBCT (17 tyg. po zabiegu), widoczne zmniejszenie defektu kostnego, spowodowane przebudową i inkorporacją przeszczepu w otaczającą tkankę kostną. CBCT skan w płaszczyźnie strzałkowej, widoczne wypełnienie defektu kostnego po cystektomii, wypełnione tkanką kostną z ogniskami przejaśnień, miejsc mineralizacji beleczek kostnych

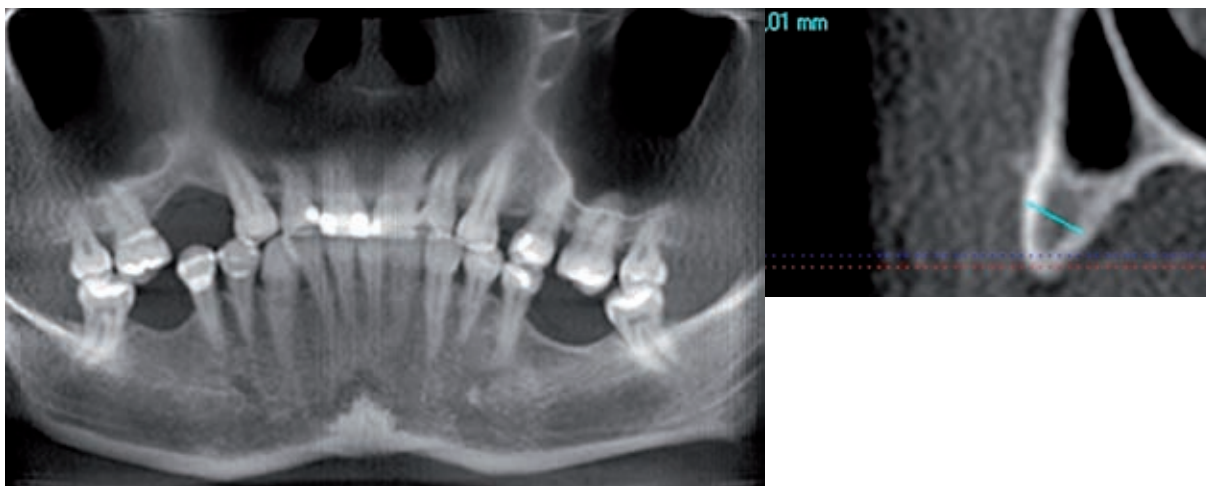
Fig. 6. Control opg (2 weeks after surgery). Graft stabilized with miniplates, control CBCT (17 weeks after surgery), decreasing of bone defect due to bone graft remodeling and incorporation into adjacent bone. CBCT medial scan, visible higher mineralization of the trabecule of remodeled bone graft



Pacjent 2

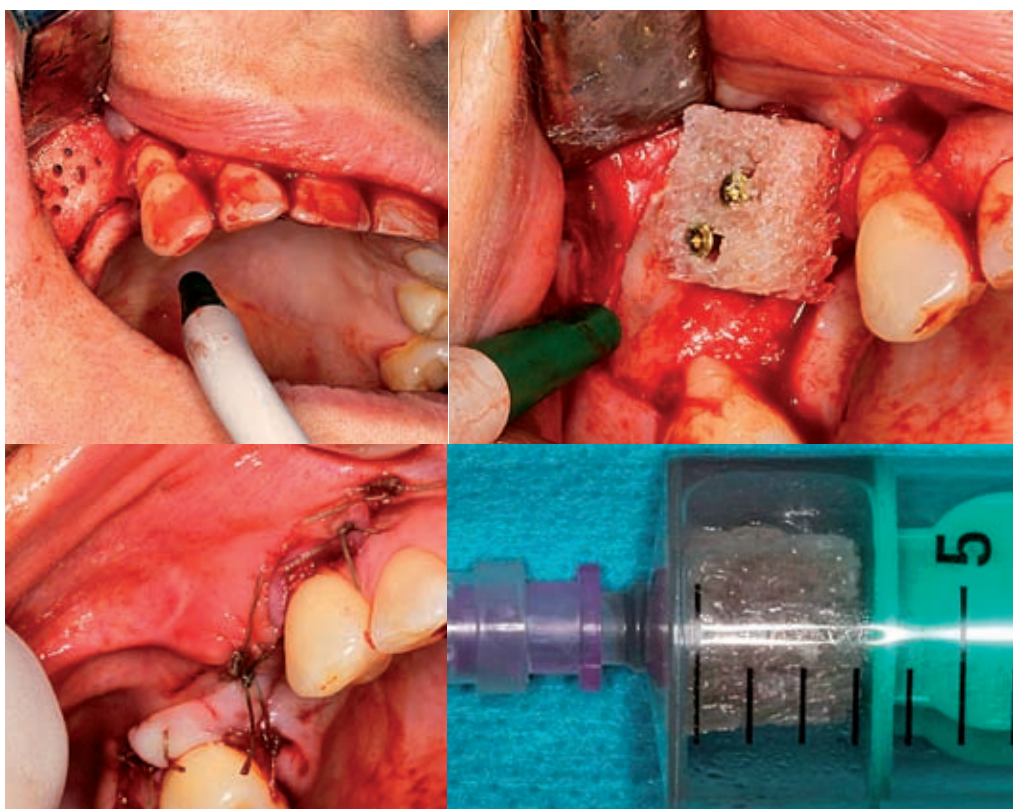
49-letnia kobieta zgłosiła się do Zakładu Chirurgii Stomatologicznej w celu leczenia implantoprotetycznego braku zębów 13–15. Na podstawie badania klinicznego i radiologicznego stwierdzono niedostateczną ilość tkanki kostnej w miejscu 13–15 do przeprowadzenia implantacji (ryc. 7). Zaplanowano

zabieg augmentacji tkanki kostnej. W Centralnym Szpitalu Klinicznym pobrano szpik pacjentki, z którego wyizolowano komórki macierzyste, poddane następnie indukcji wzrostu. W znieczuleniu nasiękowym 2% lidokainą nacięto i odwarstwiono płat śluzówkowo-okostnowy w okolicy 13–15. Wykonano kilka otworów nawiercających/odżywczych kości (ryc. 8). Ubytek kostny wypełniono bloczkiem kost-



Ryc. 7. Pacjent 2. CBCT panorex, defekt kostny wertykalno-horizonalny okolicy 14, 15. Skan okolicy 14, niewystarczająca ilość tkanki kostnej do leczenia implantoprotetycznego

Fig. 7. Patient No. 2. CBCT, panorex, vertical-horizontal bone defect – 14, 15 tooth site, insufficient bone for implant therapy



Ryc. 8. Przygotowanie łoża kostnego, wykonanie perforacji, otworów odżywczych w części korowej. Przygotowanie przeszczepu, podciśnieniowa infiltracja nośnika allogenicznego autogennymi, hodowanymi *in vitro* preosteoblastami. Stabilizacja bloku kostnego z wykorzystaniem śrub (Medartis). Zamknięcie miejsca wszczepu, rany

Fig. 8. Buccal bone preparation, perforation for nutritional reasons in cortical bone. Bone graft preparation, preosteoblasts infiltration of the graft in the syringe with under-pressure. Bone graft stabilization use screws (Medartis). Closing flap, suturing



Ryc. 9. Opg (po 10 dniach od zabiegu). Widoczna okolica 14, 15, śruby stabilizujące przeszczep, widoczne zarysy i wertykalna granica przeszczepu. CBCT, widoczny przeszczep stabilizowanyi śrubami z przestrzenią do osteogenezy, widoczne strefy przejaśnień przeszczepu, ogniska mineralizacji (16 tyg. od zabiegu)

Fig. 9. Opg (10 days after surgery), two screws stabilized of bone graft, visible vertical graft border. CBCT, graft stabilized by screws, space for osteogenesis, bone remodelling (16 week after surgery)

nym pokrytym preosteoblastami i ustabilizowano za pomocą 2 śrub (Medartis). Zmobilizowano płat do przykrycia przeszczepu i ranę zaopatrzone szwami. Pacjentka przyjmowała Augmentin 0,625 (2 × 1), Metronidazol 0,25 (2 × 2). Następnie wykonano badanie CBCT, na którym uwidoczniono pozycję przeszczepu (ryc. 9). Szwy usunięto po 10 dniach.

Wyniki

W obu omówionych przypadkach klinicznie stwierdzono znakomite gojenie się ran, widocznie przyspieszone w stosunku do podobnych zabiegów bez wykorzystania wszczepianych komórek oraz czynników stymulujących gojenie się ran i regenerację tkanek. Badanie CBCT wykonane po 16–17 tygodniach od zabiegu wykazało przebudowę przeszczepów, ich inkorporację w łożo kostne, oraz pojawienie się wczesnych ognisk mineralizacji na bazie istniejącego rusztowania.

Omówienie

Metody inżynierii tkankowej w chirurgii stomatologicznej są stosowane w celu wytworzenia kości *de novo*, w miejscu, gdzie jej brak. Celem zabiegów jest regeneracja, odtworzenie wszystkich tkanek na podobieństwo procesów embryonalnych, zgodnie z zasadami GBR i biomimetyki jednocześnie. Do prawidłowego i wydajnego prze-

biegu regeneracji tkanki kostnej są niezbędne, jak wspomniano wyżej, 3 składowe według Lynch. Najlepszym przykładem pierwszego elementu – nośnika jest świeża kość autogenna w postaci uformowanego przeszczepu lub wiórów kostnych, jest to tzw. złoty standard [15–20]. Choć wykorzystanie kości autogennej ma niewątpliwe zalety, jest najbardziej skuteczne z punktu widzenia biologicznego i klinicznego. Procedura wykonania przeszczepu, konieczna w przypadku rozległych ubytków kostnych, wiąże się z: podwójnym zabiegiem chirurgicznym, osłabieniem kości w miejscu pobrania, przedłużeniem czasu trwania zabiegu i zwiększoną możliwością wystąpienia dolegliwości pooperacyjnych [16], a także martwicy przeszczepu – rzadko. Miejscem dawczym w obrębie szkieletu kostnego twarzy może być m.in. gałąź żuchwy, podbródek, okolice guza szczęki lub obszar międzyotworowy żuchwy [2]. W rozległych rekonstrukcjach wykorzystuje się przeszczep z talerza kości biodrowej, rzadziej piszczelowej i kości sklepienia czaszki [2]. Wspomniane metody należą do inwazyjnych i traumatycznych, z tego względu w wielu przypadkach mogą spotkać się z odmową pacjenta. W takich sytuacjach optymalnym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie bloków kostnych, m.in. pochodzenia allogenicznego, mimo pewnych ograniczeń pozabiologicznej natury [21]. Przeszczepy allogeniczne dzięki zastosowaniu sterylizacji radiacyjnej w połączeniu z głębokim mrożeniem są pozbawiane immunogenności i potencjalnej zakaźności, a standardy ich procesowa-

nia czynią z bloków allogenicznych ważny materiał kościozastępczy i nieznacznie kościotwórczy [16, 22, 23]. Badania dowiodły, że ludzkie przeszczepy kostne (*Human Bone Allografts* – HBA) wykazały skuteczność w regeneracji kości, dzięki ich zdolnościom do zapewnienia trójwymiarowej struktury dla nowo tworzącej się kości i utrzymania zdolności indukcyjnych, mimo małego stężenia BMPs białek morfogenetycznych kości [24]. Wykazano, że przeszczepy allogenne przy zastosowaniu odpowiednich technik chirurgicznych w regionach implantacji mogą być alternatywą dla przeszczepów autologicznych [24]. Choć preparaty allogeniczne pozbawione komórek ulegają przebudowie i rewaskularyzacji, to w porównaniu do kości autogennej proces ten trwa dłużej [22]. Jedynie przeszczepy autogenne wprowadzone do ubytku mają zdolności uruchomienia wszystkich podstawowych mechanizmów prowadzących do odbudowy kostnej, tzn. aktywności osteogennej, osteoindukcji i osteokondukcji [25, 26].

Przedstawiona, zastosowana w WUM, procedura jest pionierska, w dostępnym piśmiennictwie nie ma opisanych etapów procedury: zarówno hodowla, jak i różnicowanie komórek macierzystych pochodzących ze szpiku, uzyskanie 45 oraz 37 milionów preosteoblastów w warunkach hodowli w ciągu 4 tygodni, następnie ich infiltracja i przeszczepienie na nośniku allogenicznego bloku kostnego kości gąbczastej, stabilizacja mikropłytkami. Poprzednio publikowana metodologia oraz wyniki klinicznego stosowania izolowanych komórek macierzystych CD34+ na nośniku ksenogennym (minerał kostny) w liczbie 1–1,6 mln komórek/przeszczep nie różniły się od metody GBR z zastosowaniem masy płytkowej wysoko zagęszczonej, pozyskiwanej profesjonalnie (Cobe-Spectra) w warunkach Banku Komórek Macierzystych. Wyniki zastosowania komórek macierzystych CD34+ w augmentacji tkanki kostnej miały w 2003 r. również charakter pionierski, trudno jednak mówić o spektakularnych rezultatach poprzedniej, opisanej w 2003 r. metodologii. Przyczyną braku istotnych wyników stosowania komórek CD34+ była ich liczba (praktycznie o rząd wielkości mniejsza od obecnie opisanej) oraz brak ukierunkowania tych komórek w linię osteoblastyczną. Autorzy sądzą, iż komórki macierzyste CD34+ przeszczepione w liczbie 1–1,6 mln/przeszczep w dużej mierze różnicowały się w komórki linii monocytarnej, rozpoznając obcy materiał – minerał kostny ksenogenny, co stwierdzono w badaniach immunohistochemicznych (zwiększona ekspresja kwaśnej fosfatazy winianoopornej TRAP, markera osteoklastów, niepublikowane wyniki).

W przeprowadzonych badaniach i zabiegach oraz omówionych przypadkach w celu przyspieszenia odbudowy tkanki kostnej i zwiększenia wydajności całego procesu regeneracji przeszczepy allogeniczne kości zasiedlono populacją preosteoblastów powstałych w wyniku docelowej hodowli komórek macierzystych ukierunkowanych na linię komórek osteogennych. Klinicznie stwierdzono bardzo dobre gojenie się ran, widocznie przyspieszone w stosunku do podobnych zabiegów bez wykorzystania wszczepianych komórek lub czynników stymulujących gojenie się ran i regenerację tkanek. Obrazy radiologiczne analizowane po 16–17 tygodniach od wszczepienia wykazują przebudowę przeszczepów, ich inkorporację w łożo kostne oraz pojawienie się wczesnych ognisk mineralizacji na bazie istniejącego rusztowania. Należy sądzić, iż allogeniczne beleczki kostne stały się atrakcyjnym podłożem dla przeszczepionych, hodowanych *in vitro*, preosteoblastów ze znacznym potencjałem osteogennym w istniejących niszach kostnych. Istotna wydaje się liczba przeszczepionych preosteoblastów, które prawdopodobnie zachowują się podobnie jak osteogenne komórki wyściółkowe (*lining cells*), dające początek osteogenezie.

Komórki macierzyste odgrywają ważną rolę w naprawie każdego narządu i tkanek przez ich zdolność do samoodnowy i różnicowania [27–30]. W obserwowanym współcześnie postępie w stomatologii regeneracyjnej tematem rozważań stały się implikacje technologii z wykorzystaniem komórek macierzystych (*stem-cell-based therapy*) [27]. Wydaje się, że komórki macierzyste dzięki stabilnej i przyspieszonej formacji kości stanowią obiecującą strategię, umożliwiającą osiągnięcie regeneracji dużych ubytków kostnych [27]. Podczas Srebrnego Jubileuszowego Szczytu The Academy of Osseointegration w 2010 r. stwierdzono, że dalsza poprawa *implant success rate* będzie możliwa dzięki zastosowaniu technologii z wykorzystaniem komórek macierzystych, które dzięki właściwościom osteogennym wpływają na formację doskonałej jakości kości. Jej obecność przyczynia się do zwiększenia długoterminowego sukcesu leczenia implantologicznego [27]. Zatem wykorzystanie metody augmentacji kości z użyciem przeszczepów allogenicznych zasiedlonych komórkami macierzystymi/preosteoblastami może okazać się kluczem do prawidłowej regeneracji w zaawansowanych przypadkach ubytków kostnych oraz w przypadkach niedostatecznej szerokości wyrostka zębodołowego przed planowaną implantacją.

Piśmiennictwo

- [1] WOJTOWICZ A.: Current views on the implant rehabilitation using titanium and ceramic implants with simultaneous bone augmentation of the jaws. *Kształcenie Podyplomowe 2010*, 2, 45–50 (in Polish).
- [2] GERBER-LESZCZYŹYŹYŹ H., PAWLAK W., RUTKOWSKA M., DOMINIAK M.: Posttraumatic alveolar ridge augmentation by autogenous bone graft and distraction osteogenesis – preliminary report. *Dent. Med. Probl.* 2005, 42, 159–164 (in Polish).
- [3] KAING L., GRUBOR D., CHANDU A.: Assessment of bone grafts placed within an oral and maxillofacial training programme for implant rehabilitation. *Austral. Dent. J.* 2011, 56, 406–411.
- [4] CLEMENTINI M., MORLUPI A., CANULLO L., AGRESTINI C., BARLATTANI A.: Success rate of dental implants inserted in horizontal and vertical guided bone regenerated areas: a systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2012, 41, 847–852.
- [5] WOJTOWICZ A., MACIEJASZ P., JOVANOVIĆ S.: Clinical use of recombinant human bone morphogenetic protein hrBMP2 in the bone augmentation of the mandible – a case report; *Implants: Internat. Mag. Oral Implant.* 2009, 3, 16–19 (in Polish).
- [6] KOCHANOWSKA I., CHABEREK S., WOJTOWICZ A., MARCZYŃSKI B., WŁODARSKI K., DYTKO M., OSTROWSKI K.: Expression of genes for bone morphogenetic proteins BMP-2, BMP-4 and BMP-6 in various parts of the human skeleton. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2007, 8, 12–18.
- [7] WOJTOWICZ A., WIECZOREK P., MONTELLA A., BANDIERA P., OSTROWSKI K.: The expression of metalloproteinases (MMP1,2,3), transforming growth factor (TGFbeta) and bone morphogenetic protein (BMP6) in embryogenesis of the maxillary sinuses in humans. *Czas. Stomatol.* 2004, 57, 125–132 (in Polish).
- [8] KOCHANOWSKA I.E., WŁODARSKI K., WOJTOWICZ A., KINSER A., OSTROWSKI K.: BMP-4 and BMP-6 involvement in the osteogenic properties of the HeLa cell line. *Exp. Boil Med. (Maywood)* 2002, 227, 57–62.
- [9] KOCHANOWSKA I.E., WŁODARSKI K., WOJTOWICZ A., NIEMIRA K., OSTROWSKI K.: Osteogenic properties of various HeLa cell lines and the BMP family genes expression. *Ann. Transplant.* 2002, 7, 58–62.
- [10] WOJTOWICZ A., CHABEREK S., URBANOWSKA E., OSTROWSKI K.: Comparison of efficiency of platelet rich plasma, hematopoietic stem cells and bone marrow in augmentation of mandibular bone defects. *New York State Dent. J.* 2007, 73, 41–45.
- [11] WOJTOWICZ A., SZOSTAK D., MAŁEJCZYK J.: Tissue engineering in oral surgery – review of new methodology. *Nowa Stomatol.* 2002, 7, 1, 41–45 (in Polish).
- [12] WOJTOWICZ A., CHABEREK S., KRYSZTA L., URBANOWSKA E., CIECHOWICZ K.: Fourier and fractal analysis of maxillary alveolar ridge repair using platelet rich plasma (PRP) and inorganic bovine bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2003, 32, 84–86.
- [13] WOJTOWICZ A., CHABEREK S., KISŁOWSKA-SYRYCZYŃSKA M., URBANOWSKA E., WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W., OSTROWSKI K.: Maxillary bone augmentation using autologous bone marrow, hematopoietic stem cells and platelet rich plasma: fractal analysis of radiographs. *Post. Biol. Komórki* 2003, 30 suppl. 21, 115–126 (in Polish).
- [14] CIEŚLIK-BIELECKA A., BIELECKI T., GAŻDZIK T., CIEŚLIK T.: Growth factors in the platelet-rich plasma as autogenic material which stimulates bone healing processes. *Czas. Stomatol.* 2006, 59, 510–517 (in Polish).
- [15] WOJTOWICZ A., PEREK J., MARCZYŃSKI B.: Autogenous bone grafts “gold standard” potential source of BMPs. *Implants. intern. Mag. Oral Implant.* 2006, 1, 48–50 (in Polish).
- [16] PUCHAŁA P., KUCHARSKI G., JAREMCZUK B., MONKOS-JAREMCZUK E.: Review of biomaterials on the basis of the literature. *TPS* 2008, 10, 2, 28–36 (in Polish).
- [17] ZHANG Z.: Bone regeneration by stem cell and tissue engineering in oral and maxillofacial region. *Front. Med.* 2011, 5, 401–413.
- [18] ANDRÁS D., TAMÁS H., ZSOLT N., SÁNDOR B.: Comparison of autologous bone graft remodeling from different donor sites in the jaws using cone beam computed tomography. *Fogorv Sz.* 2012, 105, 91–98.
- [19] MISCH C.M.: Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 1997, 12, 767–776.
- [20] ZOUHARY K.J.: Bone graft harvesting from distant sites: concepts and techniques. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* 2010, 22, 301–316.
- [21] GOMES K.U., CARLINI J.L., BIRON C., RAPOPORT A., DEDIVITIS R.A.: Use of Allogeneic Bone Graft in Maxillary Reconstruction for Installation of Dental Implants. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2011, 69, 54.
- [22] KOŻLIK M., WÓJCICKI P., RYCHLIK D.: Bone-replacement preparations. *Dent. Med. Probl.* 2011, 48, 547–553 (in Polish).
- [23] WOJTOWICZ A., BAR P., CHABEREK S., KAMIŃSKI A., OLENDER E., URBANOWSKA E., PEREK J., JĘDRZEJCZAK W., SZANIAWSKA K.: Fourier analysis of human histology of augmented bone after transplantation of stem cells CD43+ incubated on allogenic scaffold. *Clin. Oral Impl. Res.* 2012, 23 (in press).
- [24] BAVETTA G., LICATA M.E.: The use of human allogenic Graft (HBA) for maxillary bone regeneration: review of literature and case reports. *Curr Pharm Des.* 2012, 18, 5559–5568 (in Polish).
- [25] PIĘTKA T., KRZYMAŃSKI G., DOMAŃSKI W., PRZYBYSZ J.: Allogenic frozen bone and autogenic bone marrow grafts in the treatment of extensive jawbone defects. *Czas. Stomatol.* 2007, 60, 312–320.
- [26] TONELLI P., DUVINA M., BARBATO L., BIONDI E., NUTI N., BRANCATO L., ROSE G.D.: Bone regeneration in dentistry. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 2011, 8, 24–28.
- [27] EGUSA H., SONOYAMA W., NISHIMURA M., ATSUTA I., AKIYAMA K.: Stem cells in dentistry – Part II: Clinical applications. *J. Prost. Res.* 2012, 56, 229–248.

- [28] EGUSA H., SONOYAMA W., NISHIMURA M., ATSUTA I., AKIYAMA K.: Stem cells in dentistry. Part I: stem cell sources. *J. Prost. Res.* 2012, 56, 151–165.
- [29] ZAIDI N., NIXON A.J.: Stem cell therapy in bone repair and regeneration. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007, 1117, 62–72.
- [30] BAJADA S., MAZAKOVA I., RICHARDSON J.B., ASHAMMAKHI N.: Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen Med.* 2008, 2, 169–183.

Adres do korespondencji

Andrzej Wojtowicz
Zakład Chirurgii Stomatologicznej WUM
ul. Nowogrodzka 59
02-006 Warszawa
tel.: +48 22 502 1242
e-mail: awojt@kcs.amwaw.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 30.01.2013 r.
Po recenzji: 26.02.2013 r.
Zaakceptowano do druku: 5.03.2013 r.

Received: 30.01.2013
Revised: 26.02.2013
Accepted: 5.03.2013